

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Isolierung und Charakterisierung einer
toxisch wirkenden Substanz von
Pseudomonas aeruginosa

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Rolf Pflüger
Tierarzt aus Homberg/Efze

Gießen 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. Blobel

Isolierung und Charakterisierung einer
toxisch wirkenden Substanz von
Pseudomonas aeruginosa

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen



Eingereicht von
Rolf Pflüger
Tierarzt aus Homberg/Efze

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. H. Goller

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1974



Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1.0 Einleitung</u>	1
<u>2.0 Literaturübersicht</u>	3
2.1 Vorkommen und Bedeutung toxisch wirkender Substanzen von <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	3
2.2 Vorkommen und Bedeutung einer Protease (Elastase) von <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	4
<u>3.0 Material und Methoden</u>	7
3.1 <u>Pseudomonas aeruginosa</u> - Stämme	7
3.2 Zellkulturen	7
3.21 Gewinnung und Einstellung der Testzellen	8
3.3 Nährmedien	8
3.4 Gewinnung zellfreier Kulturüberstände zur Auswahl toxisch wirkender <u>Pseudomonas aeruginosa</u> - Stämme	9
3.5 Anreicherung der toxisch wirkenden Substanz	10
3.51 Einengung der Kulturüberstände	10
3.52 Gelfiltration	10
3.53 Isoelektrisches Fokussieren	11
3.6 Reinigung der Protease	12

	Seite
3.7 Nachweis enzymatischer Aktivitäten	13
3.71 Agarplatten zum Enzymnachweis	13
3.72 Messung der proteolytischen Aktivität	13
3.73 Messung der elastolytischen Aktivität	14
3.74 Messung der Lactat- und Glutamatdehydrogenaseaktivität (LDH, GLDH)	15
3.75 Nachweis der hämolytischen Aktivität	15
3.8 Beurteilung der Zytotoxizität der gereinigten Protease (Elastase)	16
3.9 Gewinnung von Antiserum gegen Protease	17
3.91 Neutralisationstest	17
3.92 Doppelte Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony	18
3.10 Bestimmung des Proteingehaltes	18
3.11 Inaktivierung der Protease durch Erwärmung	18
3.12 Chemotaxis	19
<u>4.0 Ergebnisse</u>	20
4.1 Identifizierung der Pseudomonaden	20
4.2 Vorkommen der toxisch wirkenden Substanz	20

	Seite
4.3 Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen für die Toxinbildung	20
4.31 Toxinbildung bei verschiedenen Temperaturen	20
4.32 Toxinbildung in verschiedenen Nährmedien	24
4.4 Toxin- und Enzymbildung im Vergleich zum Bakterienwachstum	25
4.41 Proteasebildung in verschiedenen Nährmedien	25
4.5 Anreicherung der toxisch wirkenden Substanzen	29
4.51 Gelfiltration des angereicherten Materials	29
4.52 Isoelektrisches Fokussieren	34
4.6 Reinigung der Protease	36
4.7 Eigenschaften der gereinigten Protease (Elastase)	39
4.71 Wirkung auf Zellkulturen	39
4.711 Freisetzung zellgebundener Enzyme nach Einwirken der gereinigten Protease	46
4.72 Inaktivierung der Protease durch Erwärmung	46

	Seite
4.8 Immunologische Untersuchungen	49
4.81 Neutralisationstest	49
4.82 Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony	49
4.9 Chemotaktische Eigenschaften der ge- reinigten Protease	52
<u>5.0 Diskussion</u>	54
<u>6.0 Zusammenfassung</u>	56
<u>7.0 Literaturverzeichnis</u>	59
Lebenslauf	

1.0 Einleitung

Pseudomonas aeruginosa ist in den letzten Jahren als Erreger schwerwiegender und medikamentell schwierig zu beeinflussender Infektionskrankheiten häufig in Erscheinung getreten. Bereits im vorigen Jahrhundert erkannten 1862 LÜCKE⁵⁰ und 1872 SCHRÖTER⁷⁸ in dieser Bakterienart den Erreger des "blaugrünen Eiters" und nannten ihn Bacillus pyocyaneus.

Die Pathogenität wurde jedoch lange Zeit in Frage gestellt, da man in P. aeruginosa harmlose Saprophyten sah, die nur selten Infektionen verursachten¹⁵. Seit etwa 1900 galt die Pathogenität von P. aeruginosa als gesichert². Heute wird dieser Keim als einer der bedrohlichsten gram-negativen Bakterien bezeichnet¹.

P. aeruginosa tritt vor allem in Krankenhäusern als Problemkeim auf⁵⁵. Dort konnten diese Bakterien an vielen Geräten und Instrumenten, die für die Pflege von Patienten Verwendung fanden, nachgewiesen werden^{20,64,88}. PULVERER und KORTH⁷⁰ sprachen sogar von einem "Pseudomonaden-Hospitalismus".

Die Ursachen für die immer häufiger auftretenden P. aeruginosa-Infektionen sind verschiedener Art.

P. aeruginosa vermag sich durch ein weit entwickeltes Enzymsystem an minimale Nährstoffbedingungen zu adaptieren¹ und sich zwischen 5°C und 42°C zu vermehren⁸⁹. Dadurch können die Pseudomonaden auch unter ungünstigen Umweltbedingungen überleben⁷, was wiederum zu einer weiten Verbreitung im Lebensbereich von Mensch und Tier führt⁶⁴.

P. aeruginosa besitzt eine hohe Resistenz gegenüber den meisten heute gebräuchlichen Antibiotika sowie gegenüber manchen Desinfektionsmitteln, besonders quartäre Ammoniumbasen⁵⁹. Die vermehrte Zahl von Patienten, die durch die Behandlung von Breitspektrumantibiotika, Kortikosteroiden,

zytotoxischen und immunsuppressiven Präparaten eine geschwächte Immunabwehr besitzen, begünstigt den Ausbruch von P. aeruginosa - Infektionen ^{2, 21, 84}. P. aeruginosa - Infektionen treten vor allem bei Frühgeborenen und unterentwickelten Kindern, in ihrer Widerstandskraft geschwächten Patienten und bei älteren Personen auf ⁵⁵.

Obwohl dieser Keim in der Lage ist, jedes Körperteil zu infizieren ¹, sind die bevorzugten Prädispositionsstellen der Gehörgang, Hautverletzungen, besonders Brand-⁵⁹ und Tracheotomiewunden ⁸¹.

Im Vordergrund der Infektionen stehen lokale Entzündungserscheinungen ⁸. In letzter Zeit traten aber auch gehäuft Sepsisfälle mit einem tödlichen Ausgang auf ^{12, 23}.

Die häufigsten durch P. aeruginosa verursachten Krankheiten beim Menschen sind: Gastroenteritis, Infektionen der Haut, der Harnwege und des Respirationstraktes, Meningitis, Konjunktivitis, Otitis und Empyeme ^{15, 27}. In der Veterinärmedizin wurden Enteritiden, Rhinitiden und Meningitiden beim Schwein ^{15, 83}, Mastitiden und Infektionen des Genitaltraktes beim Rind beobachtet ^{25, 26, 63}.

Darüber hinaus erwiesen sich Kulturfiltrate von P. aeruginosa auch für eine Reihe von Versuchstieren, Insekten, Gewebekulturen, Monozyten und Pflanzen als toxisch ²⁸.

Die Ursachen für die Pathogenität von P. aeruginosa sind noch weitgehend ungeklärt. Es werden verschiedene Enzyme, der extrazelluläre Schleim und ein sogenanntes "Exotoxin" verdächtigt, an der Virulenz des Keimes teilzuhaben.

Ziel dieser Arbeit war es, die toxische Komponente aus dem Kulturüberstand zu isolieren und ihre Wirkungsweise näher zu charakterisieren.

2.0 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Vorkommen und Bedeutung toxisch wirkender Substanzen von Pseudomonas aeruginosa

Versuche mit einem zellfreien Kulturfiltrat von P. aeruginosa führte bereits CHARRIN durch ¹⁵. Es gelang ihm, mit bakterienfreien Kulturfiltraten von P. aeruginosa ähnliche Symptome zu erzeugen, wie mit den isolierten Bakterien selbst. Er hielt daher diesen Keim für einen echten Toxinbildner ¹⁵. Diese Annahme wurde durch die Versuche von LYSENKO ⁵¹ unterstützt, der der sogenannten "toxischen Substanz" einen extrazellulären Charakter zuschrieb. Neben einem Endotoxinkomplex, der den Krankheitsverlauf nicht zu beeinflussen schien ^{15, 79}, erwiesen sich verschiedene von P. aeruginosa produzierte Enzyme wie Proteasen, Elastase, Lecithinase und Lipase als toxische Substanzen ^{22, 27, 32, 40, 44, 47, 53, 74}.

Neben der Protease (Elastase) kam vor allem der Lecithinase Bedeutung zu, die nach intrakutaner Injektion zu Ödemen und sterilen Abszessen führte ⁴⁴. BERK ⁵ und LIU ⁴³ beschrieben ein thermostabiles Hämolysin, dessen Toxizität jedoch bisher nicht eindeutig geklärt worden ist.

Besondere Beachtung fand neuerdings auch der an der Zelloberfläche von P. aeruginosa befindliche Schleim. Da mit dem isolierten Schleim ähnliche Symptome wie bei einer Pseudomonaden - Infektion erzeugt werden konnten, schien er direkt am Infektionsverlauf beteiligt zu sein ^{14, 19, 46, 79}. Als weiterer möglicher Virulenzfaktor wurde ein hitzelabiles, trypsinempfindliches "Exotoxin" genannt, das jedoch bisher nur bei einem protease-negativen P. aeruginosa - Stamm nachweisbar war ^{13, 32, 45}. Dieses "Exotoxin" war in Dosen von 6 µg letal für Mäuse ⁴⁵. In Gewebekulturen verhinderte

es die Aufnahme von Uridin und Aminosäuren und in Leberzellen blockierte es die mitochondriale Atmung in vitro 68,69.

MEINKE und BERK⁵⁴ fanden ebenfalls ein nicht - proteolytisches "Exotoxin", das im Gegensatz zu dem von LIU⁴⁵ beschriebenen Toxin hitzestabil war.

2.2 Vorkommen und Bedeutung einer Protease (Elastase) von Pseudomonas aeruginosa

Von den mutmaßlichen Virulenzfaktoren von P. aeruginosa ist die Protease (Elastase) bisher am eingehendsten untersucht worden.

Seit MARGARETTEN et al.⁵² bei mit P. aeruginosa - infizierten Personen eine nekrotisierende Vasculitis beobachtete, die sie auf die proteolytische Aktivität der Pseudomonaden zurückführten, schenkte man der Proteasebildung dieses Keimes besondere Aufmerksamkeit. MULL und CALLAHAN⁵⁸ konnten bei experimentellen Versuchen an Mäusen eine Zerstörung der elastischen Membran von Blutgefäßen beobachten. Intranasale und intravenöse Injektionen des Enzyms führten zu hämorrhagischen Läsionen und Nekrosen in verschiedenen Organen sowie zum Tode der Mäuse^{44,53}.

Dermonekrosen entstanden nach intrakutaner Injektion der Protease^{32, 53}, da das Elastin der Haut (Dermis) ein gut verwertbares Substrat für pseudomonadale Protease ist²⁹.

Auch bei der P. aeruginosa - Sepsis des Menschen konnten regelmäßig hämorrhagische Nekrosen¹⁷ und oft verteilt liegende alveoläre Hämorrhagien⁸² nachgewiesen werden. Bei Infektionen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich machte das befallene Gewebe den Eindruck, als würde es wegschmelzen³⁰. Diese Veränderungen schrieb HOCHSTRASSER et al.³⁰ dem Einfluß aktiver Proteasen zu. Experimentell ließen sich durch

pseudomonadale Proteasen Corneageschwüre bei Nagern hervorrufen^{22,40}. Mit Trypsin war das nicht möglich²².

BOTZENHART und EBEL⁸ konnten die proteasehaltige Fraktion ihrer Kulturüberstände als Träger der zytotoxischen Wirkung identifizieren. Eine gerinnungshemmende Wirkung der Protease (Elastase) von P. aeruginosa infolge von Fibrinogen- und Fibrinspaltung wurde von SCHARMANN und KRAFT⁷⁵ beschrieben.

MÜLLER^{59,60,61} wies in vivo und in vitro Veränderungen an Plasmaproteinen vom Menschen durch P. aeruginosa - Protease nach. Seiner Meinung nach beruhte die Bedeutung des Enzyms für die Virulenz der Pseudomonaden darin, daß es im Gegensatz zu den Proteasen anderer Bakterien native Proteine spaltete.

MUSZINSKY⁶² wies auf den Zusammenhang zwischen Proteasebildung und Virulenz hin. Hochvirulente Stämme produzierten höhere Proteaseaktivitäten als schwach virulente Stämme⁶². LIU und HSIEH⁴⁸ glaubten dagegen, daß schwache Proteasebildner virulenter waren, da bei ihnen ein proteaseempfindliches "Exotoxin" in geringerem Maße durch die eigenen Proteasen inaktiviert wurde.

Die Protease (Elastase) von P. aeruginosa wurde während des Zellwachstums ausgeschieden⁷⁴. Ihre Aktivität war bereits zu Beginn der logarithmischen Wachstumskurve nachweisbar⁷⁴. JOHNSON et al.³² und SCHARMANN⁷³ konnten die Elastase bei fast allen von ihnen untersuchten P. aeruginosa-Stämmen nachweisen. Andere Autoren^{29,56,58} berichteten von einem geringeren Vorkommen. Das könnte jedoch dadurch erklärt werden, daß sie nicht den von SCHARMANN⁷³ benutzten Elastinagar verwendeten, der einen sehr empfindlichen Nachweis der Elastaseaktivität ermöglichte.

Nach MORIHARA⁵⁶ und OAKLEY und BANERJEE⁶⁵ gehört die Elastasebildung zu den spezifischen Eigenschaften von P. aeruginosa.

Elastase konnte neben P. aeruginosa auch bei P. maltophilia und Aeromonas hydrophila nachgewiesen werden⁷³. Die beiden letztgenannten Bakterienarten waren wie P. aeruginosa in letzter Zeit wiederholt als fakultative Erreger von Infektionskrankheiten aufgetreten⁷³. SCHARMANN⁷³ hielt deshalb die Elastase von P. aeruginosa für einen wichtigen Virulenzfaktor. HEDBERG et al.²⁹ sahen dagegen keinen direkten Zusammenhang zwischen Elastasebildung und Virulenz, da der Prozentsatz elastase-positiver P. aeruginosa-Kulturen sehr hoch war.

Die Frage, ob die proteolytischen Wirkungen von einem einzigen oder verschiedenen Enzymen ausgehen, ist noch ungeklärt, da die Proteasebildung vom Kulturmedium abhängig ist⁵⁶. SCHARMANN und BALKE⁷⁴ gelang es bei Verwendung eines komplexen Nährmediums nicht, immunologisch unterschiedliche Proteasen nachzuweisen.

LIU⁴⁵ konnte, als er Kaninchenserum als alleinige Nährstoffquelle verwendete, nur geringe Proteasemengen feststellen, da das Enzym durch α_2 -Makroglobulin im Serum gehemmt wurde³⁰.

In neueren Untersuchungen wurde über die Isolierung einer Elastase mit kollagenolytischer Aktivität berichtet^{18,22,41}. Andere Autoren konnten bei ihren Versuchen diese Enzymaktivität nicht nachweisen^{57,85}.

Eine eingehende Charakterisierung der gereinigten Elastase wurde von MORIHARA et al.⁵⁷ und SCHARMANN und BALKE^{4,74} vorgenommen. Die aus verschiedenen Stämmen isolierten Proteasen wiesen Molekulargewichte von 39.000⁵⁷ und 22.300⁷⁴ auf. Die isoelektrischen Punkte lagen bei pH 5,9⁵⁷ bzw. 6,45 und pH 5,7⁷⁴. Beide Enzyme erwiesen sich als hitzelabil und wurden bei Temperaturen von 55°C⁵⁷ nach 10 Min. bzw. 70°C⁴ nach 10 Min. inaktiviert. Die Temperaturoptima der elastolytischen und caseinolytischen Aktivitäten des Enzyms lagen bei 55°C bzw. bei 63°C⁴.

3.0 Material und Methoden

3.1. Pseudomonas aeruginosa - Stämme

Als Untersuchungsmaterial dienten 20 P. aeruginosa-Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Bakteriologie und Immunologie, Gießen. Die Identifizierung³⁸ der Pseudomonaden erfolgte mit Hilfe der Gramfärbung, der Cytochromoxidase-Reaktion³⁹, der Gelatineverflüssigung, durch die oxidative Glukosespaltung³¹, die Pigmentbildung³⁵ und durch das Wachstum bei 42°C im Glycerol-Mannitol - Acetamid-Cetrimid-Agar (GMAC)³³. Die Beweglichkeit der Bakterien wurde im hängenden Tropfen unter einem Phasenkontrastmikroskop untersucht.¹⁾ Die Typisierung der Stämme mit Pyocinen führte KIRCHNER³⁶ durch.

3.2. Zellkulturen

Als Zellkulturen wurden L-Zellen, Kälberhodenzellen und Nierenzellen vom Kaninchen und Schwein verwendet.

Als Nährmedien dienten Lawitt (PMC - 13)²⁾ und TC Minimal Eagle dried³⁾ unter Zusatz von CaCl_2 und Glutamin in einer Endkonzentration von 0,002 % und 0,003 %.

Phenolrot⁴⁾ in einer Endkonzentration von 0,002 % wurde als pH-Indikator verwendet.

1) Typ Standard GFL, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

2) Serva, Heidelberg

3) Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA

4) Merck, Darmstadt

Vor Gebrauch wurden dem Nährmedium 10 % bzw. 2 % fötales Kälberserum¹⁾ (Anzugs- bzw. Erhaltungsmedium) zugesetzt. Zur Verhinderung bakteriellen und mykotischen Wachstums wurde dem Nährmedium Penicillin, Streptomycin und Moronal²⁾ (Nystatin) in Konzentrationen von 100 E/ml, 0,1 mg/ml und 25 E/ml zugesetzt^{66,67}.

3.21 Gewinnung und Einstellung der Testzellen

Die Einstellung und Gewinnung der Testzellen erfolgte nach der Methode von GABLIKS und SOLOTOROVSKY²⁴. Die Zellen wurden durch Trypsinisierung von Stockkulturen bzw. von den entsprechenden Organen gewonnen. Danach wurden sie im Anzugsmedium suspendiert und auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 2 ml der Suspension wurden in Kulturröhrchen gegeben und bei 37°C stationär solange bebrütet, bis sich der Zellrasen geschlossen hatte.

3.3 Nährmedien

Als Nährmedien dienten Trypticase Soy Broth (TSB)³⁾ und Trypticase Soy Agar (TSA)³⁾. Dem flüssigen Medium wurde nach dem Autoklavieren Glukose in 0,5 %iger Endkonzentration zugesetzt. Die längere Aufbewahrung der Pseudomonaden erfolgte in einem Lackmusmilchmedium³⁶.

Für den fortlaufenden Gebrauch wurden die Kulturen alle 7 Tage auf frischen TSA übertragen, 24 Std. bei 37°C bebrütet und danach bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Zur Ermittlung eines für die Toxinproduktion optimalen Nährmediums kamen neben TSB ohne und mit Zusatz verschied-

1) Bio Cult Laboratories Ltd. Washington, USA

2) von Heyden GMBH, München

3) Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA

dener Glukosekonzentrationen noch Nutrient Broth (NB)¹⁾, Brain-Heart Infusion (BHI)¹⁾ und ein synthetisches Nährmedium nach PULVERER und KORTH⁷⁰, dem als alleinige Kohlenhydratquelle 2 % Glukose zugesetzt wurde, zur Anwendung. Die Abhängigkeit der Proteaseproduktion von verschiedenen Nährmedien wurde mit dem P. aeruginosa-Stamm 75 untersucht. Außer den obengenannten flüssigen Nährmedien verwendete ich noch Plasma vom Menschen, Rind und Schaf, fötales Kälberserum²⁾ und Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)³⁾.

3.4 Gewinnung zellfreier Kulturüberstände zur Auswahl toxisch wirkender Pseudomonas aeruginosa - Stämme

Die Kulturüberstände der 20 P. aeruginosa - Stämme gewann ich dadurch, daß je 20 ml TSB in 100 ml - Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie einer 18 Std. bei 37°C bebrüteten TSA - Kultur beimpft und 12 Std. bei 32°C geschüttelt wurden. Danach wurde 1 ml dieser Vorkultur in 50 ml TSB mit 0,5 % Glukose in 1000 ml - Erlenmeyerkolben überimpft und 24 Std. bei 32°C geschüttelt.

Nach Abzentrifugieren der Bakterien, 10 Min. bei 23.500 x g, filtrierte ich den Kulturüberstand.⁴⁾ Die Aufbewahrung erfolgte bis zu einer Woche bei + 4°C oder für längere Zeit bei - 18°C. Anhand der P. aeruginosa - Stämme 47 und 75 wurde die Abhängigkeit der Toxin- und Enzymproduktion bei 42°C, 37°C, 32°C und 23°C und von der Bebrütungszeit

1) Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA

2) Bio Cult Laboratories Ltd. Washington, USA

3) Serva, Heidelberg

4) Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA

ermittelt. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei 620 nm verfolgt¹⁾.

Die Kulturüberstände untersuchte ich auf ihre Toxizität, indem ich je 3 weißen Mäusen von 18 - 22 g 1 ml intraperitoneal injizierte. Die Beurteilung der Toxizität für Mäuse erfolgte nach folgendem Schema:

1 + = Tod innerhalb 24 Std.

2 + = Tod innerhalb 12 Std.

3 + = Tod innerhalb 6 Std.

4 + = Tod innerhalb 1 Std.

5 + = Tod innerhalb 30 Min.

3.5 Anreicherung der toxisch wirkenden Substanz

Die Toxinanreicherung wurde mit den Kulturüberständen von 10 P. aeruginosa - Stämmen durchgeführt.

3.51 Einengung der Kulturüberstände

Die Kulturüberstände engte ich durch 24-stündige Dialyse bei 4°C gegen Polyäthylenglykol (PEG - 20.000)²⁾ ein.

Durch anschließendes Dialysieren gegen neutrale, physiologische NaCl-Lösung konnte eine 10-fache Konzentrierung des Ausgangsvolumens erreicht werden.

3.5 2 Gelfiltration

Die Fraktionierung an Sephadex G - 100 - superfine³⁾ der durch Dialyse gegen Polyäthylenglykol eingeengten Kulturüberstände führte ich an einer Säule, 25 x 400 mm, durch. Als Elutionspuffer diente 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6,

1) Spectronic 20 , Bausch & Lomb, Rochester, New York, USA

2) Serva, Heidelberg

3) Pharmacia fine chemicals, Uppsala, Schweden

mit 0,15 M NaCl. Das Auftragen und Eluieren der Proben erfolgte in aufsteigender Richtung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe¹⁾ bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/Std. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf hämolytische, proteolytische, lipolytische Aktivität und auf Lecithinaseaktivität untersucht, um die photometrisch²⁾ gemessenen Proteine den einzelnen Fraktionen zuordnen zu können.

Die Untersuchung der Fraktionen auf ihre Toxizität für Mäuse geschah in der oben beschriebenen Weise. Zur Feststellung der Zytotoxizität wurde das Kulturmedium aus den Kulturröhrchen entfernt, der Zellrasen zweimal mit HBSS gewaschen, je 1 ml der Fraktionen zugegeben und 1 Std. bei 37°C bebrütet.

Die morphologischen Veränderungen der Testzellen wurden aufgrund des prozentualen Anteils geschädigter Zellen wie folgt eingeteilt¹⁶.

Eine Schädigung von	75 - 100% = 4+
Eine Schädigung von	50 - 75% = 3+
Eine Schädigung von	25 - 50% = 2+
Eine Schädigung von weniger als	25% = 1+

3.5 3 Isoelektrisches Fokussieren

Als eine weitere Reinigungsmethode und zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes führte ich die isoelektrische Fokussierung nach SCHAEF et al.⁷² durch. Als Probe verwendete ich den durch Gelfiltration aus dem Kulturüberstand des P. aeruginosa - Stammes 75 stammenden Peak, der die toxischen Substanzen für Mäuse und L-Zellkulturen enthielt.

1) "Perpex" LKB AB, Stockholm - Bromma, Schweden

2) "Uvicord II", LKB AB, Stockholm - Bromma, Schweden

Die Füllung der Säule (110 ml)¹⁾ erfolgte mit Ampholine-Puffer²⁾, pH 3,0 - 10, als pH-Gradient. Die Fokussierzeit betrug etwa 24 Std. Der Inhalt der Säule wurde in 3 ml - Fraktionen abgelassen und deren pH und Extinktion bei 280 nm bestimmt. Zur Ermittlung der Zytotoxizität entfernte ich die Trägerampholyte durch 12-stündige Dialyse gegen neutrale PBS in mehreren Wechseln soweit, daß keine Beeinflussung der Reaktionen durch vom Neutralpunkt abweichende pH-Werte möglich war.

3.6 Reinigung der Protease

Die Reinigung der Protease erfolgte nach den Angaben von MORIHARA et al.⁵⁷ und SCHARMANN und BALKE⁷⁴ unter Verwendung des P. aeruginosa - Stammes 75. Der Kulturüberstand der 24 Std. bei 32°C bebrüteten TSB-Kultur (2000 ml) mit 0,5 %igem Glukosezusatz konnte durch Zentrifugieren (10 Min., 13.000 x g) gewonnen werden. Danach fügte ich gesättigte Ammoniumsulfatlösung in einer Endkonzentration von 65 % hinzu. Nach 12 Std. wurde das entstandene Präzipitat zentrifugiert (10 Min., 17.000xg), in 200 ml 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, gelöst und die Ammoniumsulfatfällung, wie oben beschrieben, wiederholt. Das dann in 100 ml 0,01 M Tris-HCl-Puffer gelöste Präzipitat versetzte ich bei - 10°C mit - 20°C kaltem Aceton bis zu einer Endkonzentration von 70 %. Nach einer Aufbewahrung von 2 Std. bei - 20°C wurde das entstandene Präzipitat in 50 ml Tris-HCl-Puffer gelöst. Davon trug ich je 10 ml auf eine Sephadex - G - 100 - superfine²⁾ - Säule (25 x 450 mm)¹⁾ auf, die aufsteigend mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer mit 0,2 M NaCl eluiert wurden.

1) LKB Produkter, AB Stockholm - Bromma, Schweden

2) Pharmacia fine chemicals, Uppsala, Schweden

Die proteasehaltigen Fraktionen wurden gesammelt und 36 Std. gegen das 100-fache Volumen 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, bei dreimaligem Wechsel dialysiert.

3.7. Nachweis enzymatischer Aktivitäten

3.7 1 Agarplatten zum Enzymnachweis

Proteasen wurden mit Caseinagar⁷⁶, Lipasen mit dem Tributyrinagar¹⁾ oder mit einem Agar, dem 1 % Tween 60²⁾ und 0,1 % CaCl_2 zugesetzt worden war³⁸, bestimmt. Der Eigelbagar zum Nachweis der Lecithinase bestand aus TSA, dem eine 5 %ige Eigelbemulsion¹⁾ und 0,11 % CaCl_2 zugesetzt worden war. Zur Verhinderung bakteriellen Wachstums setzte ich allen Agarplatten Merthiolat³⁾ in einer Endkonzentration von 0,0001 % hinzu.

3.7 2 Messung der proteolytischen Aktivität

Die quantitative Bestimmung der proteolytischen Aktivität erfolgte mit dem Caseintest⁴². Casein nach Hammersten⁴⁾ wurde nach der Methode von WILKINSON⁸⁷ in Lösung gebracht und mit Aqua bidest. eine 1 %ige Lösung hergestellt, die bei - 20°C aufbewahrt wurde. Die Reaktionslösung von 1 ml Gesamtvolumen enthielt 5 mg Casein und 0,02 ml Enzym-

1) Oxoid Ltd., London S.E. 1, England

2) Schuchardt, München

3) Lilly GMBH, Gießen

4) E. Merck, Darmstadt

lösung in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0. Fs wurde 10 Min. bei 30°C inkubiert, und anschließend die Reaktion mit 0,2 ml einer 12,5 %igen Trichloressigsäurelösung gestoppt. Die Proben blieben 20 Min. bei Zimmertemperatur stehen und wurden dann 10 Min. bei 6000 x g zentrifugiert. Die durch die enzymatische Reaktion entstandenen Abbauprodukte des Caseins, die mit Trichloressigsäure nicht ausgefällt wurden, bestimmte ich mit dem Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz¹⁾. Die Extinktion wurde bei 750 nm²⁾ gemessen und mittels einer Tyrosineichkurve in Tyrosin-Äquivalente umgerechnet. Als eine Enzymeinheit wurde diejenige Enzymmenge bezeichnet, die im Testansatz umgerechnet soviel Tyrosin/Min. freisetzte, wie der Extinktion von 1 µmol Tyrosin entsprach.

3.7 3 Messung der elastolytischen Aktivität

Die quantitative Bestimmung der elastolytischen Aktivität erfolgte durch die kolorimetrische Methode von SACHAR et al.⁷¹

Die Reaktionslösung (20 mg autoklaviertes Orcein - Elastin³⁾, 2 ml 0,03 M Tris-HCl, pH 8,0 und 1 ml Enzymlösung) wurde in sterilen Schraub Röhrchen 8 Std. auf einer Wippe bei 37°C geschaukelt. Danach wurde die Reaktion durch 2 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,0, gestoppt. Die Reaktionslösung filtrierte ich und bestimmte die optische Dichte bei 590 nm²⁾.

1) E. Merck, Darmstadt

2) Spektralphotometer, PMQ II, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

3) Sigma, London Chem. Co. Ltd.

3.7 4 Messung der Lactat- und Glutamatdehydrogenase-aktivität (LDH, GLDH)

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität der in L-Zellen enthaltenen LDH und GLDH wurde zunächst das Medium aus dem Kulturröhrchen entfernt und der Zellrasen 2mal mit HBSS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit einer 1 %igen Natrium-desoxycholatlösung 15 Min. und 30 Min. bei 37°C bebrütet. Das so gewonnene Zelllysate zentrifugierte ich für 10 Min. bei 6000 x g und untersuchte den zellfreien Überstand auf den Gehalt an LDH⁶ und GLDH³⁴. Die größte Extinktionsdifferenz zwischen Leerwert und Probe nach 5 Min. Messzeit setzte ich gleich 100 %.

Zur Messung der aus den L-Zellen nach Einwirken der gereinigten Protease austretenden LDH und GLDH präparierte ich den Zellrasen in oben beschriebener Weise. Nach Zugabe der Proteaselösung, die pro ml 0,05 mg Protein (300 E) enthielt, wurden die Zellkulturen 1 Std. bei 37°C bebrütet. Nach 5, 10, 20 Min. fortlaufend bis 60 Min. entnahm ich Proben aus der Testlösung und bestimmte ihren Gehalt an LDH und GLDH. Die Umrechnung erfolgte in % ausgetretener Aktivität der Zellenzyme.

3.7 5 Nachweis der hämolytischen Aktivität

Der Nachweis der hämolytischen Aktivität erfolgte an Blutzellen des Schafes. Die Proben wurden in einer 2-fachen Verdünnungsreihe in "Phosphat Buffer Solution" mit einer 1 %igen Erythrozytensuspension 1 Std. bei 37°C bebrütet und anschließend 1 Std. bei 4°C aufbewahrt. Eine "minimale hämolytische Dosis" (MDH) war in jener Verdünnungsstufe enthalten, die noch zur vollständigen Hämolyse führte.

3.8 Beurteilung der Zytotoxizität der gereinigten Protease (Elastase)

Nach Ausbildung des Zellrasens wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen zweimal mit HBSS gewaschen. Dann gab ich je 1 ml einer 2-fachen Verdünnungsreihe der Protease in HBSS zu und bebrütete 1 Std. bei 37°C. Die Ausgangskonzentration der Proteaselösung betrug 0,1 mg Protein/ml (500 E). Die morphologischen Veränderungen der Testzellen teilte ich aufgrund des prozentualen Anteils geschädigter Zellen wie folgt ein ¹⁶:

Eine Schädigung von	75 - 100 % = 4 +
Eine Schädigung von	50 - 75 % = 3 +
Eine Schädigung von	25 - 50 % = 2 +
Eine Schädigung von weniger als	25 % = 1 +

Die kleinste toxische Dosis, die im Trypanblau-Test ¹⁶ 50 % der Zellen schädigte (2 +), bezeichnete ich als "minimale toxische Zellkultur - Dosis" (MTD₅₀).

Die morphologischen Veränderungen der Testzellen wurden unmittelbar im Phasenkontrastmikroskop ¹⁾ beobachtet. Dazu war es erforderlich, die Zellen in Petrischalen zu züchten. Den Zellrasen präparierte ich in oben beschriebener Weise. Die zugefügte Proteaselösung enthielt pro ml 0,05 mg Protein (300 E). In einem Kontrollversuch prüfte ich, ob Reste des Zellkulturmediums, die durch das Waschen mit HBSS nicht entfernt werden konnten, Einfluß auf die Aktivität der Protease ausübten. Ebenfalls wurde der Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Zytotoxizität untersucht.

1) Wasserimmersionsachromat 40/ 0,75 W, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

Die Zellkulturen wurden 1 Std. bei 4°C bzw. 37°C bebrütet. Nach 5, 10, 20, 30 Min. fortlaufend bis 60 Min. entnahm ich Proben und bestimmte die Proteaseaktivität mit Casein⁴² als Substrat. Die zugegebene Proteaselösung enthielt 0,1 mg Protein/ml (600 E).

3.9 Gewinnung von Antiserum gegen Protease

2 Kaninchen, etwa 2 - 2,5 kg schwer, wurden in Abständen von 5 Tagen viermal mit der an Sephadex G - 100 - superfine gereinigten Protease geimpft. Die Injektionslösung enthielt pro ml 1,0 mg Protein (6000 E) und wurde vor der Injektion zu gleichen Teilen mit komplettem Freund'schem Adjuvans¹⁾ vermischt. Bei der 1. Injektion wurden 3 ml, bei der 2. 5 ml, bei der 3. 7 ml und bei der letzten 10 ml an verschiedenen Körperstellen intramuskulär injiziert. 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet und das Serum gewonnen.

3.9 1 Neutralisationstest

Zur Feststellung, ob der zytotoxische Effekt auf Zellkulturen durch die Einwirkung der Protease bedingt ist, wurde im Neutralisationstest eine 2-fache Verdünnungsreihe des Antiserums mit 600 E Protease (0,1 mg Protein) 30 Min. bei 37°C bebrütet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit Casein⁴² als Substrat. Normalserum und HBSS dienten als Kontrolle.

Zur Ermittlung der MTD₅₀²⁾ der gereinigten Protease in

-
- 1) Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
 - 2) Minimale toxische Zellkultur - Dosis

Gegenwart von Antiserum wurden L-Zellen verwendet.

3.9 2 Doppelte Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony

Den Geldiffusionstest nach Ouchterlony führte ich in Petrischalen mit einer 1,5 %igen Agarlösung (Spezial-Agar Noble)¹⁾ in physiologischer NaCl-Lösung durch.

Zunächst wurden 10 ml der sterilen Lösung aseptisch in die Petrischalen gegossen und nach Erstarren des Agars mit Metallzylindern in rosettenförmiger Anordnung besetzt. Anschließend wurden 15 ml der Agarlösung hinzugegossen und nach Erstarren die Metallzylinder entfernt. Die so präparierten Löcher wurden mit je 0,1 ml der Proben beschickt, und die Petrischalen 48 Std. bei 37°C bebrütet. Als Konservierungsmittel war dem Agar Merthiolat²⁾ in einer Endkonzentration von 0,0001 % zugesetzt worden.

3. 10 Bestimmung des Proteingehaltes

Den Proteingehalt der Proben bestimmte ich nach der Methode von LOWRY et al.⁴⁹.

3. 11 Inaktivierung der Protease durch Erwärmung

Die an Sephadex G-100 - superfine gereinigte Protease (600 E/ml) wurde im Wasserbad für 10 Min. bei 40°C, 50°C fortlaufend bis auf 100°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der MTD₅₀³⁾ für L-Zellen, und die Messung der proteolytischen Aktivität mit Casein⁴² als Substrat.

1) Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

2) Lilly GMBH, Gießen

3) Minimale toxische Zellkultur - Dosis

3.12 Chemotaxis

Die chemotaktischen Eigenschaften der gereinigten Protease wurden mittels der modifizierten BOYDEN - Technik bestimmt^{9,37,90}. Die BOYDEN-Kammer bestand aus einer unteren und oberen Abteilung, die durch eine Filtermembran¹⁾, durchgängig nur für wandernde Leukozyten, getrennt waren. Die obere Abteilung wurde mit 0,5 ml einer Rinderleukozyten-suspension (6 Mill. Leukozyten/ml) beschickt. Je 0,2 ml der Testsubstanzen, die pro ml 0,1 mg bzw. 0,05 mg Protein (600 E bzw. 300 E) enthielten, wurden zunächst mit je 0,2 ml Rinderserum 10 Min. bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde das Serum für 30 Min. bei 56°C inaktiviert und mit Gey's Solution⁶⁷ zu 2 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde 0,5 ml in die untere Abteilung der Kammer gegeben, die dann 3 Std. bei 37°C bebrütet wurde. Als Negativ-Kontrolle diente Hank's Balanced Salt Solution. Nach der Bebrütung wurde die Filtermembran, die die gewanderten Leukozyten enthielt, entnommen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe fixiert, gefärbt nach WEIGERT mit Eisenhämatoxylin¹¹ und mit einem Deckglas auf einem Objektträger in Caedax²⁾ eingebettet. Die oberste Schicht, d.h. die am weitesten gewanderten Leukozyten wurden mikroskopisch ausgezählt. Als Maß für die Chemotaxis galt die durchschnittliche Zahl der gewanderten Leukozyten pro Gesichtsfeld³⁾.

1) Millipore Corporation, Bedford, Mass. USA

2) E. Merck, Darmstadt

3) Planobjektiv 40/0,65, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

4.0 Ergebnisse

4.1 Identifizierung der Pseudomonaden

Alle 20 untersuchten Stämme bestanden aus beweglichen, gram-negativen Stäbchen. Sie waren cytochromoxidase-positiv und spalteten oxidativ Glukose und Gelatine. Ihr Wachstum im GMAC-Agar bei 42°C ergab in allen Fällen die für P. aeruginosa charakteristischen Reaktionen³⁶. Alle Kulturen besaßen den Geruch nach Trimethylamin. Ihre Farbstoffbildung ist in Tab. 1 aufgeführt.

4.2 Vorkommen der toxisch wirkenden Substanz

Die Kulturüberstände der P. aeruginosa-Stämme 47 und 75 erwiesen sich für Mäuse als stark toxisch, die der Stämme 31, 44, 111 und 158 zeigten eine gute Toxinwirkung (Abb. 1). Alle anderen untersuchten Kulturüberstände waren nicht oder kaum nennenswert toxisch für Mäuse. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Toxinbildung wurden deshalb die Stämme 47 und 75 ausgesucht.

4.3 Ermittlung der optimalen Kulturbedingungen für die Toxinbildung

4.3 1 Toxinbildung bei verschiedenen Temperaturen

Bei einer Bebrütungszeit von 24 Std. erwies sich eine Temperatur von 32°C für die P. aeruginosa - Stämme 47 und 75 als optimal für die Toxinbildung (Abb. 2).

Tab. 1: Farbstoffbildung¹⁾ der 20 untersuchten Pseudomonas aeruginosa - Stämme im Medium nach KING et al.³⁵

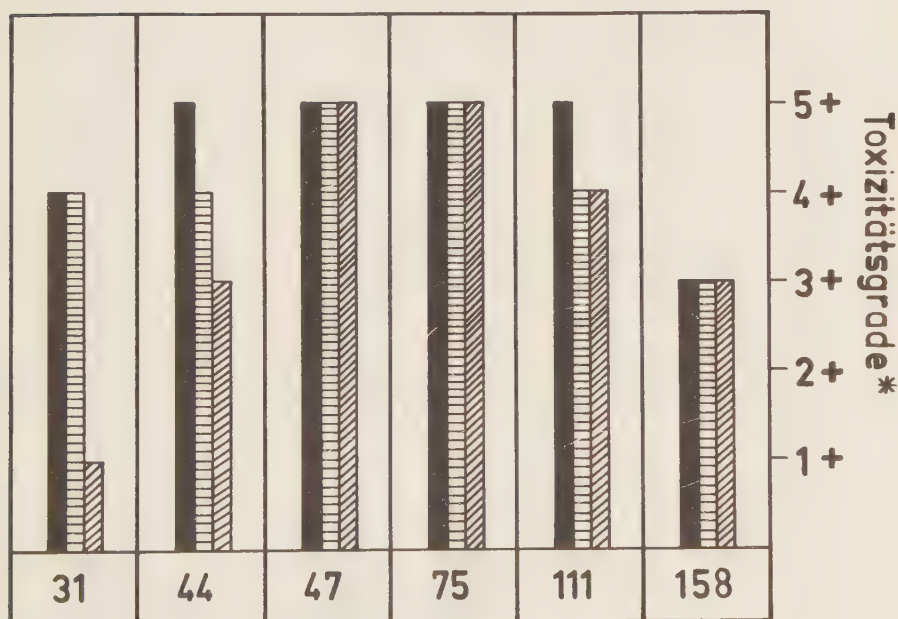
Stamm Nr.	Pyocyanin	Pyorubin	Fluorescein	dunkelbrau- nes Pigment
30	+	+	+	-
31	-	+	+	-
34	+	+	-	-
44	+	+	+	-
47	++	++	-	-
52	++	-	+	-
64	++	-	+	-
73	+	+	+	-
75	-	++	+	-
83	+	+	+	-
84	+	+	-	-
111	-	+	+	-
127	-	++	+	-
129	-	+	+	-
134	-	-	+	-
158	+	+	+	-
170	-	++	+	-
215	-	-	+	-
255	++	-	+	-
293	-	-	++	-

1) ++ Starke Farbstoffbildung

+ deutlich sichtbare Farbstoffbildung

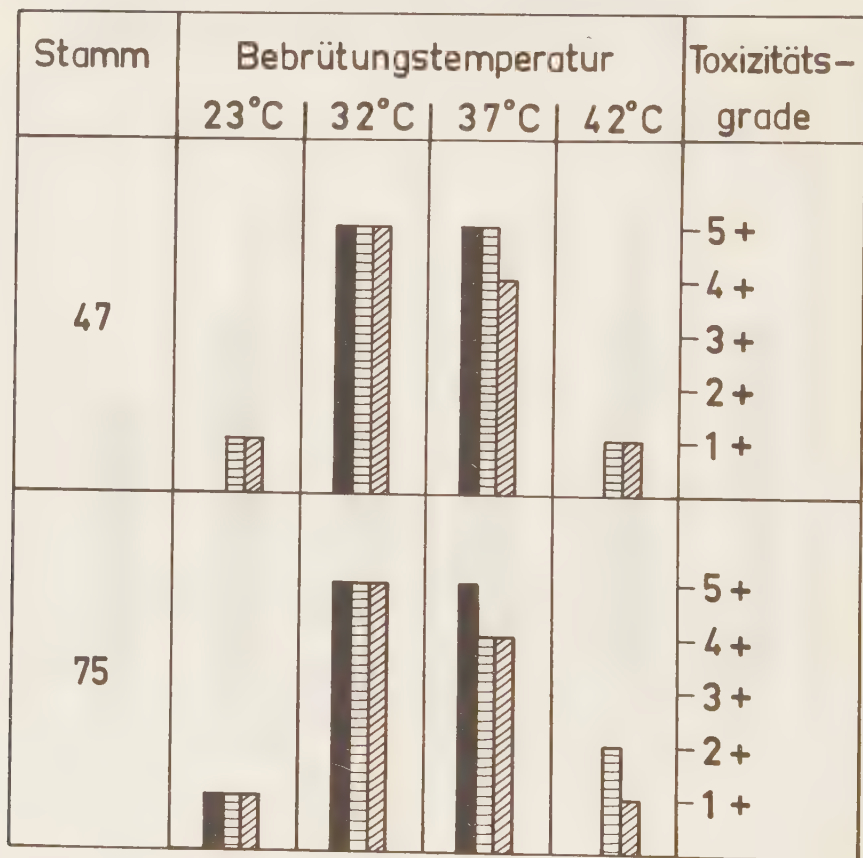
- keine Farbstoffbildung

Abb.1 Toxizität der Kulturüberstände von den *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen 31, 44, 47, 75, 111 und 158 für je 3 Mäuse (■ ▨ ▩)



* Die Toxizitätsgrade sind auf Seite 10 beschrieben worden

Abb.2 Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die Toxinbildung der Pseudomonas aeruginosa Stämme 47 und 75



■ Toxizität für je 3 Mäuse

4.3 2 Toxinbildung in verschiedenen Nährmedien

Zur Ermittlung des am besten für die Toxinbildung geeigneten Nährmediums wurde P. aeruginosa, Stamm 75, unter gleichartigen Bebrütungsbedingungen geprüft. Alle in Tab. 2 aufgeführten flüssigen Nährmedien, mit Ausnahme von Nutrient Broth und dem synthetischen Minimalnährmedium nach PULVERER und KORTH,⁷⁰ ergaben eine etwa gleich große Toxinausbeute. Eine weitere Steigerung der Toxinbildung konnte mit Tryptic Soy Broth (TSB) unter Zugabe einer sterilen Glukoselösung in einer Endkonzentration von 0,5 % bzw. 1,0 % erzielt werden.

Tab. 2 Toxinbildung von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75, in verschiedenen Nährmedien bei einer Bebrütung von 24 Std. bei 32°C

Nährmedium	mittlerer Toxizitätsgrad ¹⁾
Tryptic Soy Broth (TSB)	4 +
TSB mit 0,5 % Glukose	5 +
TSB mit 1,0 % Glukose	5 +
TSB mit 2,0 % Glukose	4 +
Brain Heart Infusion	4 +
Nutrient Broth	2 +
Synthetisches Minimal-Nährmedium	-

¹⁾ bei jeweils 3 Mäusen ermittelt

4.4 Toxin- und Enzymbildung im Vergleich zum Bakterienwachstum

Bei den P. aeruginosa - Stämmen 47 und 75 wurden die toxischen Substanzen bereits während der logarithmischen Wachstumskurve gebildet. Beide Kulturüberstände besaßen ab 24 Std. bis mindestens 54 Std. Bebrütungszeit bei 32°C maximale Toxizität für Mäuse (Abb. 3a, b).

Proteaseaktivität zeigte sich bei beiden Stämmen bereits nach 4 Std., Lipaseaktivität beim Stamm 75 nach 12 Std. und beim Stamm 47 nach 18 Std.. Die Wachstums- und Toxinbildungskurven ergaben Hinweise für die Mindestbebrütungszeit zur Erlangung der optimalen Ausbeute an toxischen Substanzen. Dieser Zeitpunkt lag für beide Stämme bei etwa 18 - 24 Std..

4.4 1 Proteasebildung in verschiedenen Nährmedien

LIU⁴⁵ konnte nach Bebrütung der Pseudomonaden in Kaninchenserum nur geringe Mengen Protease nachweisen, da das Enzym durch α_2 -Makroglobulin im Serum gehemmt wurde³⁰. Deshalb sollte hier der Einfluß, insbesondere von Plasma und Serum auf die Proteasebildung untersucht werden. Dazu wurde P. aeruginosa, Stamm 75, 24 Std. bei 32°C in den in der Tab. 3 aufgeführten Nährmedien bebrütet. Die Proteaseaktivität bestimmte ich nach 24 Std. Bebrütung mit Casein⁴² als Substrat. Bei Wachstum der Pseudomonaden in den künstlichen Nährmedien wurden mit Ausnahme von Nutrient Broth und HBSS etwa gleiche Proteasemengen gebildet. Unter den natürlichen Nährmedien erwies sich fötales Kälberserum als optimal für die Proteasebildung (Tab. 3).

Tab. 3: Proteasebildung von Pseudomonas aeruginosa,
Stamm 75, in flüssigen Nährmedien

Nährmedium	Protease-Aktivität (E/ml)	Bakterien ¹⁾ (mg/ml)	E Prot./ mg Bakt.
Menschenplasma	2860	76	38
Rinderplasma	1770	20	88
Schafplasma	660	38	17
fötales Kälber- serum	4120	36	114
Tryptic Soy Broth (TSB)	3310	22	150
TSB mit 0,5 % Glukose	3220	26	124
TSB mit 1 % Glukose	3100	25	124
Brain Heart Infusion	2950	23	124
Nutrient Broth	1070	5	214
Hank's Balanced Salt Solution	160	2	80

1) Naßgewicht

Abb. 3a Wachstum, Toxin- und Enzymbildung von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 47

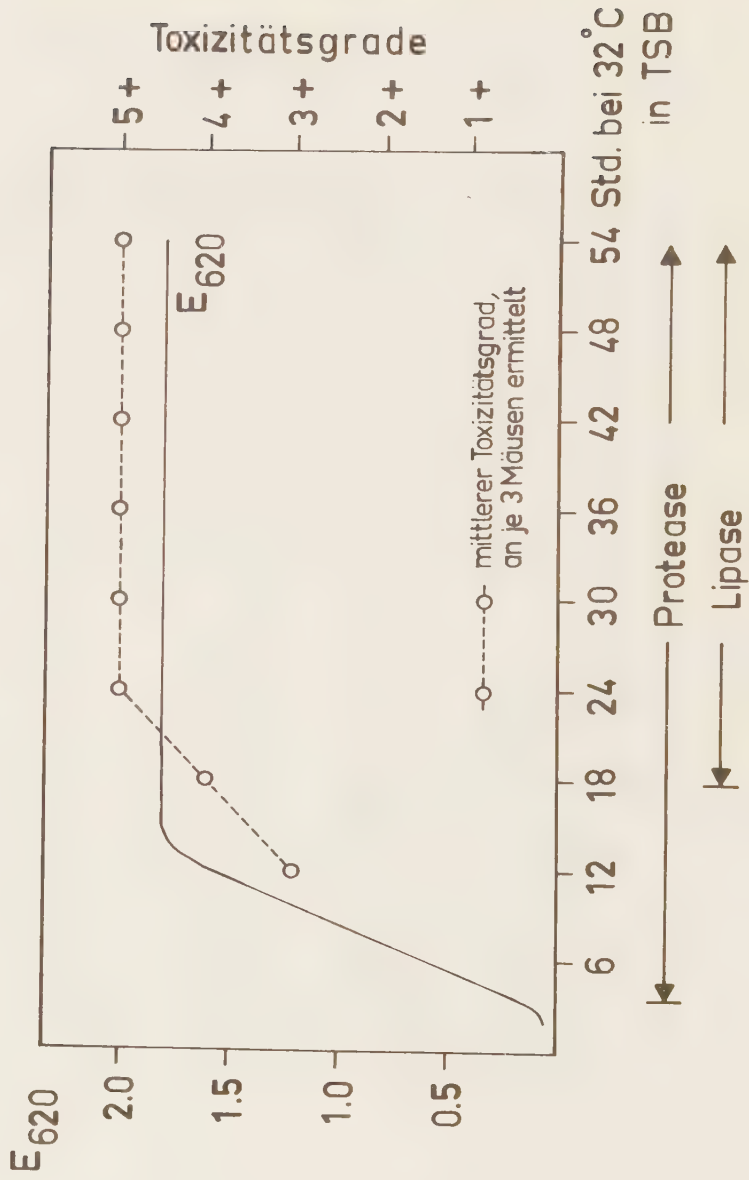
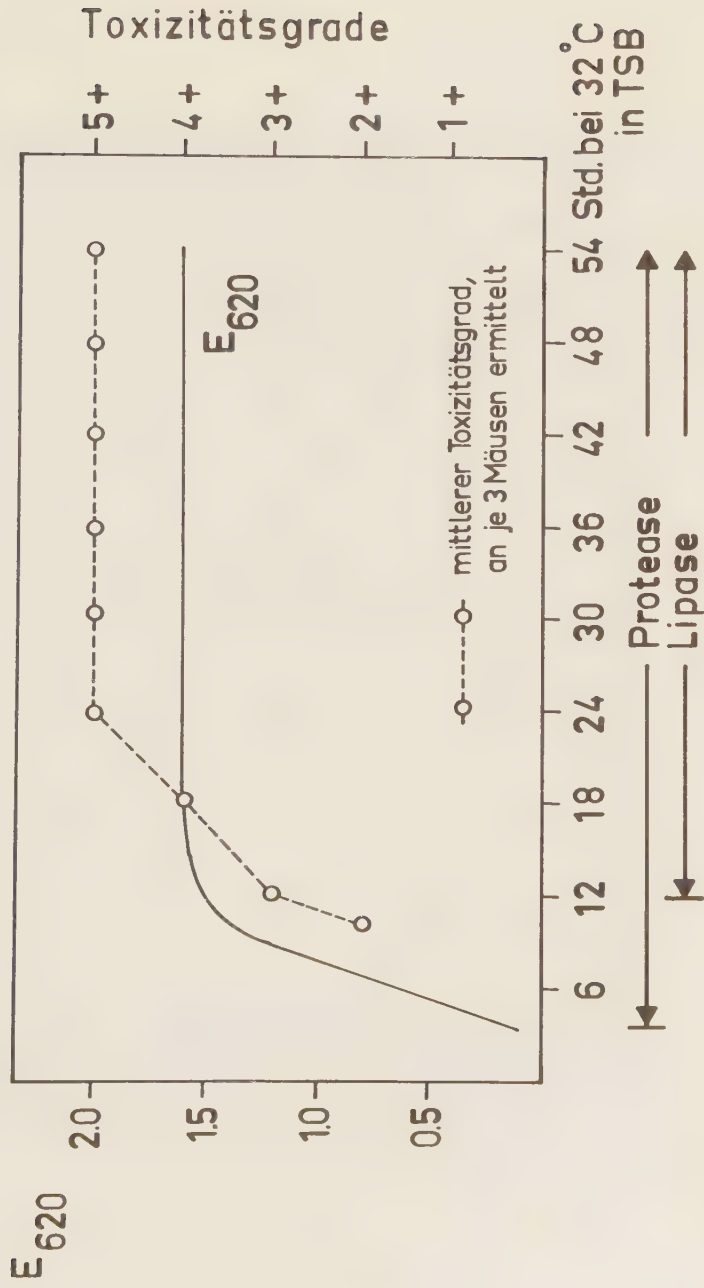


Abb.3b Wachstum, Toxin- und Enzymbildung von
Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75



4.5 Anreicherung der toxisch wirkenden Substanzen

4.5 1 Gelfiltration des angereicherten Materials

Zur Ermittlung der im Kulturüberstand enthaltenen toxischen Substanzen fraktionierte ich die mit Polyäthylenglykol eingeeengten Kulturüberstände von 10 P. aeruginosa-Stämmen an Sephadex G - 100 - superfine. Zum Äquilibrieren und zur Elution diente 0,01 M Tris-HCl-Puffer mit Zusatz von 0,15 M NaCl. Alle untersuchten Stämme bildeten innerhalb der Bebrütungszeit von 24 Std. bei 32°C Protease, Lipase und Hämolsin mit Ausnahme des Stammes 83 (Tab. 4), Lecithinase war bei keinem Stamm unter diesen Versuchsbedingungen nachweisbar. Bei Auftrennung der enzymatischen und hämolytischen Aktivitäten an Sephadex G - 100 - superfine kam es bei allen 10 P. aeruginosa - Stämmen zur Bildung von 4 Protein-Fractionen. Die lipolytische Aktivität war stets in der 1. Protein-Fraktion, und die hämolytische Aktivität stets in der 2. Protein-Fraktion zu finden. Die proteolytische Aktivität verteilte sich auf die 2. und 3. Proteinfraktion, wobei in der letztgenannten der weitaus größte Teil der Protease enthalten war (Abb. 4 a,b,c). Bei der Untersuchung der Fractionen auf ihre Toxizität für L-Zellen und Mäuse zeigte sich, daß die Protein-Fraktion mit der höchsten Proteaseaktivität Träger der toxischen Wirkung war. Nur bei den Stämmen 75 und 158 erwies sich auch die 2. Protein-Fraktion, die sowohl Protease als auch Hämolsin enthielt, als toxisch für Mäuse und L-Zellen. Die Abb. 4 a, b, c zeigen als Beispiele die Gelfiltrationskurven der P. aeruginosa - Stämme 31, 34 und 75.

Tab. 4: Enzym- und Toxinbildung¹⁾ in den Kulturüber-
ständen von 10 Pseudomonas aeruginosa - Stäm-
men nach 24 Std. Bebrütung bei 32°C

Stamm Nr.	Protease	Lipase	Lecithinase	Hämolysin
31	+	+	-	+
34	+	+	-	+
44	+	+	-	+
47	+	+	-	+
73	+	+	-	+
75	+	+	-	+
83	+	+	-	-
84	+	+	-	+
111	+	+	-	+
158	+	+	-	+

1) Der Nachweis der enzymatischen bzw. hämolytischen
Aktivitäten erfolgte qualitativ mit den entsprechenden
Test-Agarplatten bzw. an Blutzellen des Schafes.

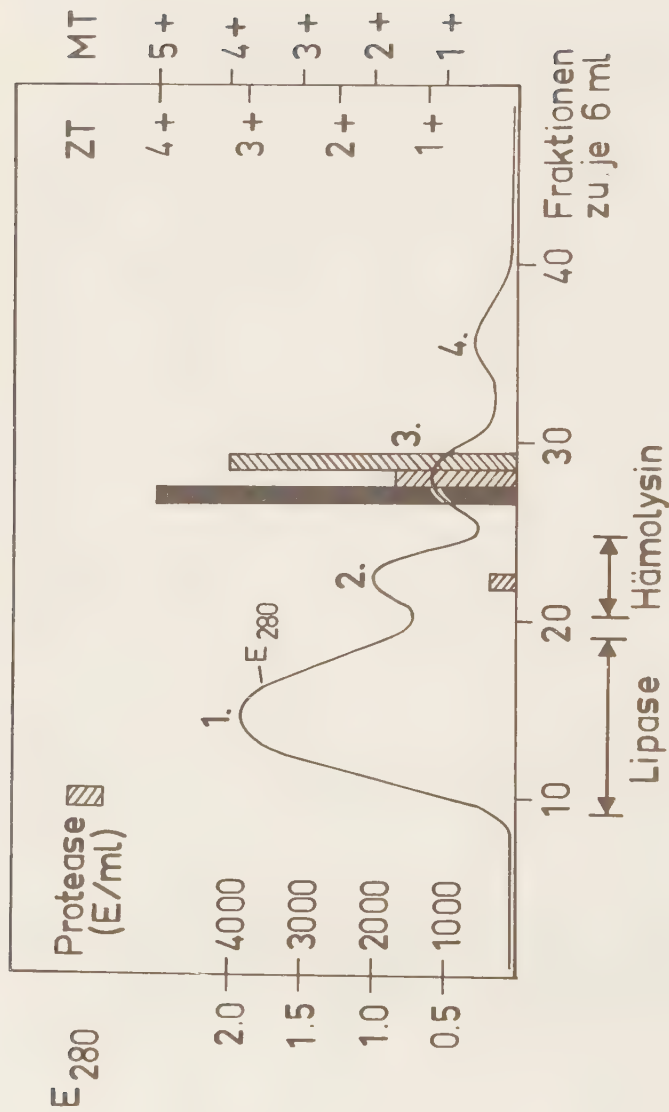


Abb.4a Gelfiltration des eingeeengten Kulturüberstandes von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 31, an Sephadex G100 superfine. ■ = Zytotoxizität für L-Zellen (ZT), ▨ = mittlere Toxizität (MT), bei 3 Mäusen ermittelt.

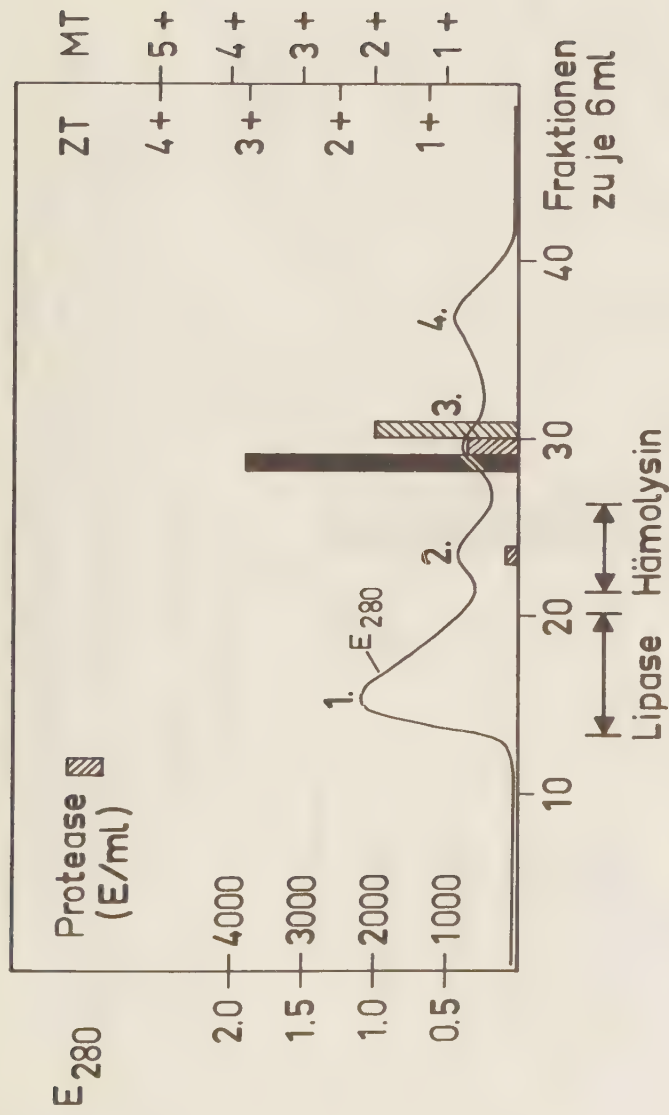


Abb.4b Gelfiltration des eingeeengten Kulturüberstandes von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 34, an Sephadex G 100 superfine. ■ = Zytotoxizität für L-Zellen (ZT), ▨ = mittlere Toxizität (MT), bei je 3 Mäusen ermittelt.

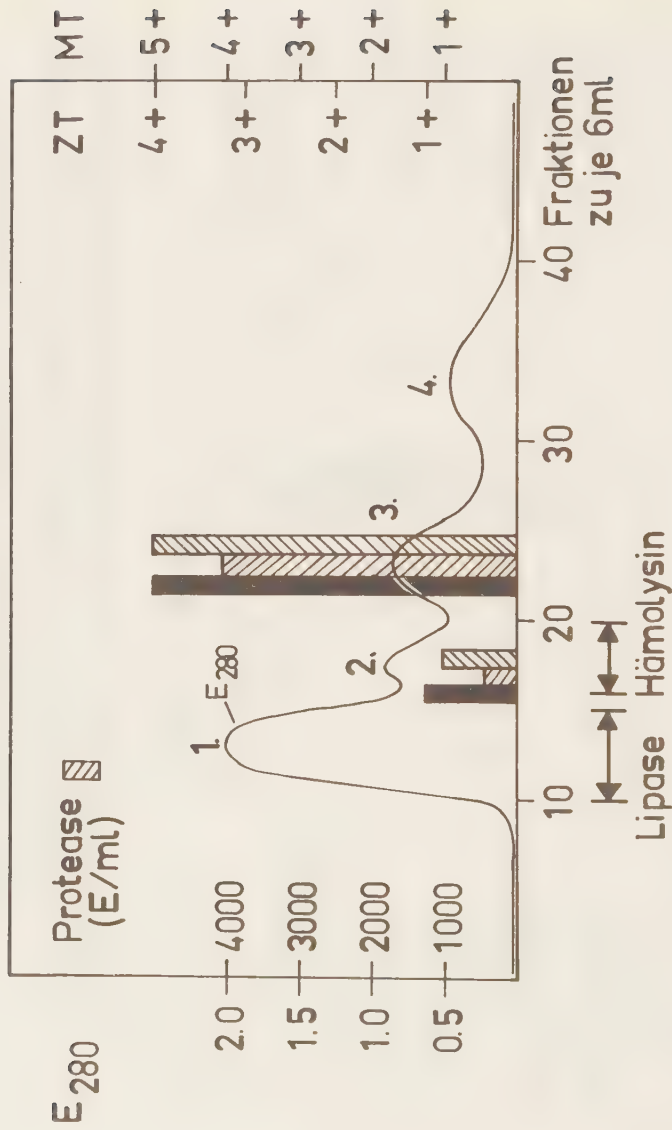


Abb.4c Gelfiltration des eingeeengten Kulturüberstandes von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75, an Sephadex G 100 superfine. ■ = Zytotoxizität für L-Zellen (ZT) ▨ = mittlere Toxizität (MT), bei 3 Mäusen ermittelt.

4.5 2 Isoelektrisches Fokussieren

Der aus dem KulturÜberstand des P. aeruginosa - Stammes 75 durch Gelfiltration an Sephadex G - 100 - superfine eluierte 3. Peak wurde durch isoelektrisches Fokussieren fraktioniert. Dieser Peak war Träger der toxischen Wirkung für Mäuse und L-Zellen. Dabei kam es zu einer Auftrennung der Protease in 2 verschiedene Komponenten (Abb. 5). Der isoelektrische Punkt lag für die Nebenkompente bei $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$ und für die Hauptkomponente bei $\text{pH } 5,6 \pm 0,2$. Die Toxizität für Mäuse und L-Zellen konnte in der Hauptkomponenten lokalisiert werden. Nach der isoelektrischen Fokussierung waren somit die Proteaseaktivität und die Toxinwirkung in demselben Peak.

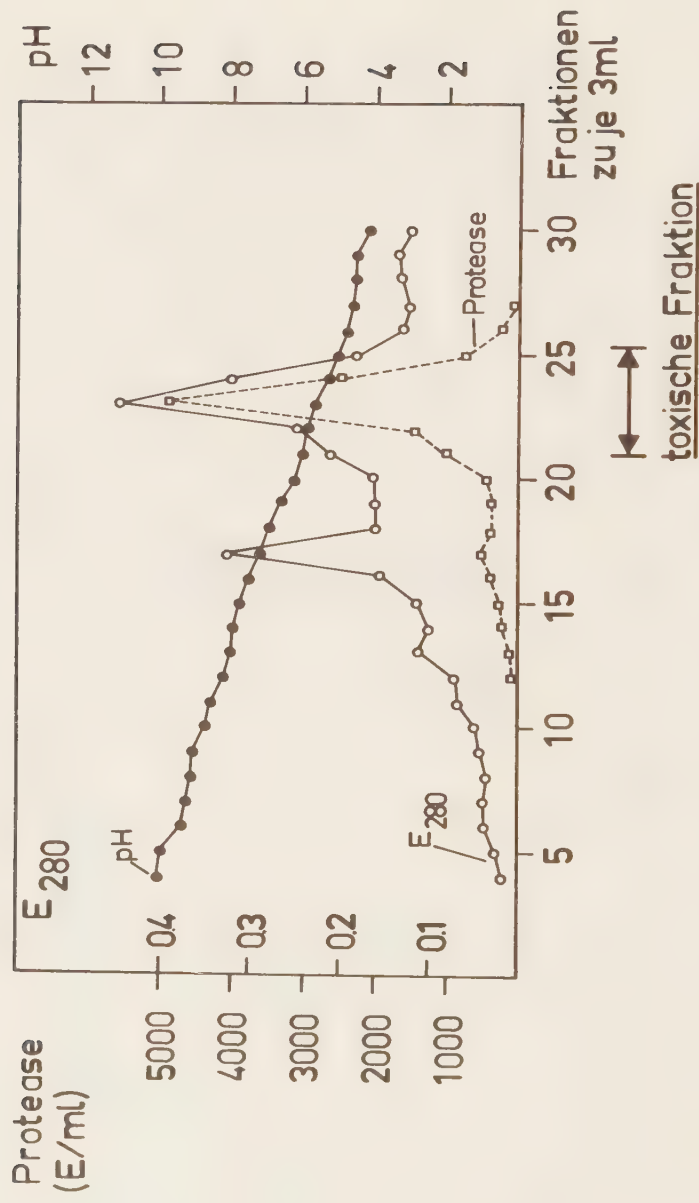


Abb.5 Isoelektrische Fokussierung der durch Gelfiltration erhaltenen 3. Protein-Fraktion (Abb.4 c) von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75

4.6 Reinigung der Protease

Der Kulturüberstand von P. aeruginosa, Stamm 75, enthielt nach 24 Std. Bebrütung bei 32°C pro ml 8,4 mg Protein (3200 E Protease). Die zweimalige Fällung des Kulturüberstandes mit Ammoniumsulfat führte zu einer 4-fachen Anreicherung der spezifischen Aktivität (E Protease/mg Protein) und zu einem 16-fachen Anstieg der hämolytischen Aktivität. Da durch Gelfiltration an Sephadex G - 100 - superfine keine vollständige Trennung von Hämolysin und Protease erreicht werden konnte, wurde das Hämolysin durch Acetonfällung eliminiert. Danach enthielt die Präparation neben der proteolytischen vor allem noch die lipolytische Aktivität. Durch nachfolgendes Fraktionieren an Sephadex G - 100 - superfine konnte jedoch die lipolytische von der proteolytischen Aktivität abgetrennt werden (Abb. 6). Die Protease wurde dabei in 2 Peaks (I und II) aufgespalten. Der später eluierte Peak II enthielt den größten Teil des Enzyms, so daß die spezifische Aktivität gegenüber dem Kulturüberstand um den Faktor 16 anstieg (Tab. 5). Beide in den Peaks I und II enthaltenen Proteasen spalteten Casein und Elastin.

Die spezifische zytotoxische Aktivität für L-Zellen (MTD₅₀/mg Protein) des Kulturüberstandes betrug 2, die des Protease - Peak II 64, so daß hier eine 32-fache Anreicherung gelang.

Tab. 5: Reinigung der Protease (Elastase) von Pseudomonas aeruginosa,
Stamm 75

Fraktionen	Volumen (ml)	Protease (E/ml)	Protein (mg/ml)	Spez. Aktivität (E/mg Prot)	Hämolyisin Aktivität (MHD 1)	MTD ₅₀ ²⁾	MTD ₅₀ /mg Prot.
Kulturüberstand	2000	3200	8,4	380	8	16	2
1. Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200	5800	5,4	1074	128	32	6
2. Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	100	6500	4,0	1625	128	32	9
Acetonfällung	50	8500	4,0	2125	0	129	32
Sephadex G-100-superfine Peak I	18	1430	0,2	2150	0	2	10
Sephadex G-100-superfine Peak II	30	6000	1,0	6000	0	64	64

1) MHD = minimale hämolytische Dosis

2) MTD₅₀ = minimale toxische Zellkulturdosis (L-Zellen)

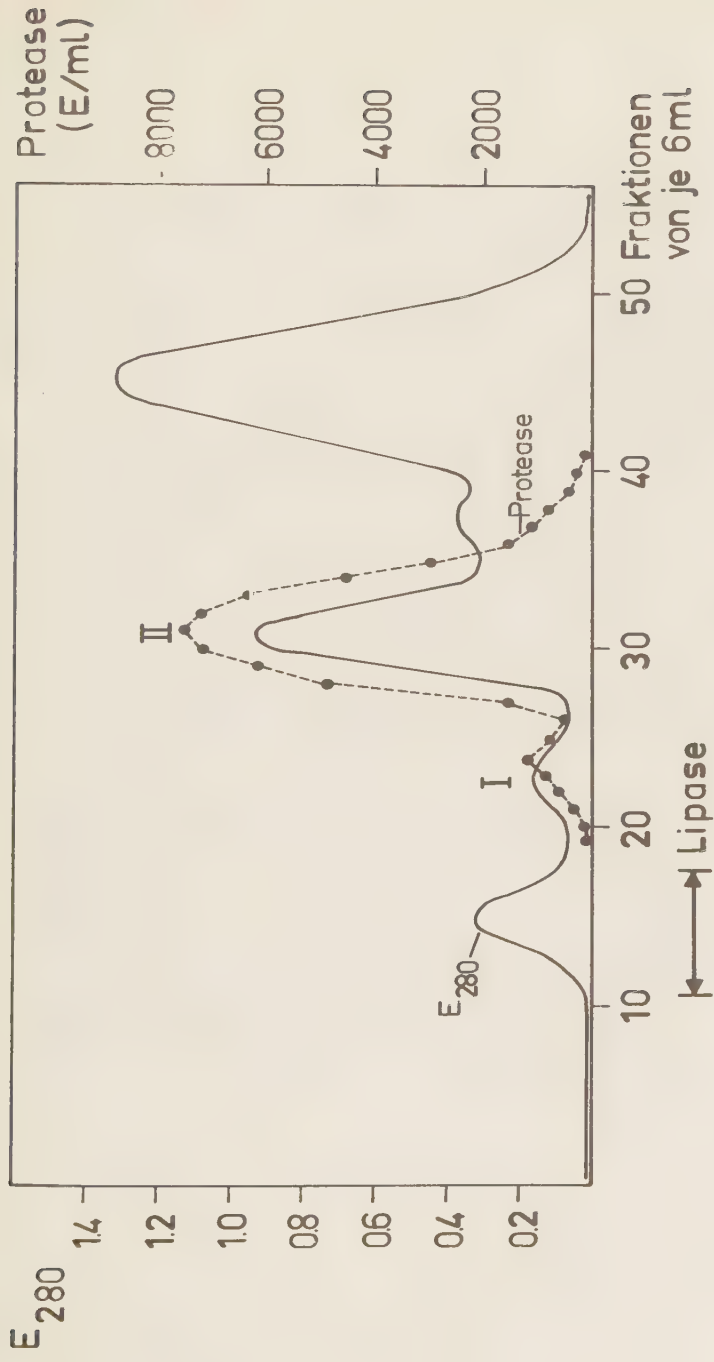


Abb.6 Gelfiltration des acetongefällten Kulturüberstandes von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75, an Sephadex G 100 superfine (I,II = Proteasepeaks I und II)

4.7 Eigenschaften der gereinigten Protease (Elastase)

4.7 1 Wirkung auf Zellkulturen

Die Empfindlichkeit verschiedener Zellkulturen gegen die Einwirkung der gereinigten Protease wurde in einer 2-fachen Verdünnungsreihe in HBSS getestet.

Die Ausgangskonzentration der in HBSS gelösten Protease betrug 0,1 mg Protein/ml (600 E). Nach einer Bebrütung von 1 Std. bei 37°C war eine MTD₅₀ in einer Verdünnungsstufe von 1 : 8 bei L-Zellen und von 1 : 16 für Kälberhodenzellen enthalten. Das bedeutete, daß 12,5 µg Protein/ml (75 E) bzw. 6,25 µg Protein/ml (37 E) ausreichten, um 50 % der L- bzw. Kälberhodenzellen zu schädigen. Nierenzellen von Kaninchen und Schwein zeigten bei der obengenannten Proteasekonzentration keine im Trypanblau-Test erfaßbaren Schädigungen. Selbst bei einer Erhöhung der Proteasekonzentration um das 10-fache auf 1,0 mg Protein/ml (6000 E) konnten keine Zellveränderungen an den Nierenzellen der beiden Tierarten beobachtet werden (Tab. 6).

Tab. 6: Empfindlichkeit von Zellkulturen gegen die
Einwirkung der gereinigten Protease

Zellarten	Herkunft	Züchtung	¹⁾ MTD ₅₀	spez. Ak- tivität MTD ₅₀ /mg-Prot.
L-Zellen	Maus (Fibro- blasten)	kontinu- ierlich	9	80
Hodenzellen	Kalb	primär	16	160
Nierenzellen	Kanin.	primär	0	0
Nierenzellen	Schwein	primär	0	0

MTD₅₀¹⁾ = minimale toxische Zellkulturdosıs

Zur Erkennung und Beurteilung der morphologischen Ver-
änderungen wurden L-Zellen und Kälberhodenzellen in Petri-
schalen gezüchtet und phasenkontrastmikroskopisch be-
obachtet. Die Art der Schädigung war in ihrem Ablauf
bei beiden Zellarten im wesentlichen gleich, so daß
hier nur die morphologischen Veränderungen der L-Zellen
beschrieben werden sollen.

Wirkung der gereinigten Protease auf L-Zellen

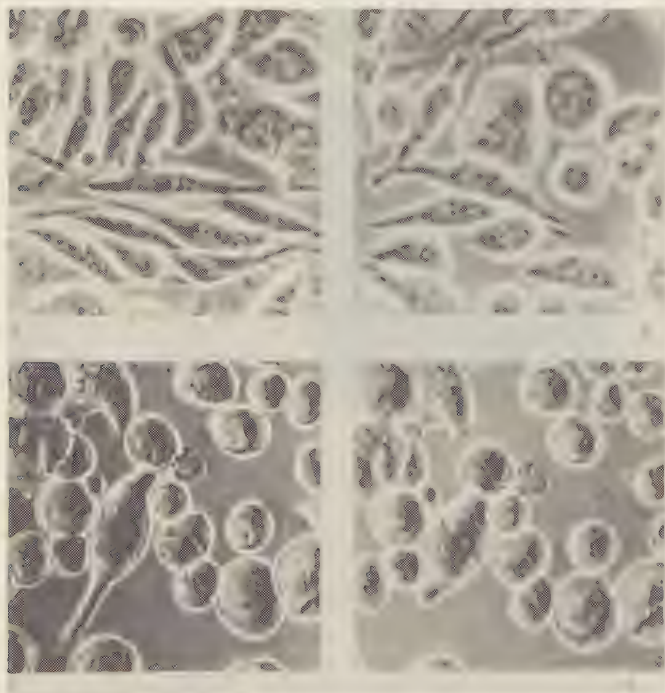
Nach Zugabe von 4 MTD₅₀ kam es nach etwa 10 Min. zum Einziehen der spindelförmigen Zellausläufer, die zum Teil auch als Zytoplasmakugeln abgeschnürt wurden. Der vorher deutlich sichtbare helle Zellkern mit mehreren dunklen Nukleolen ging von einer längsovalen Form in eine runde Form über. Nach etwa 30 Min. waren fast alle Zellen abgerundet und der Zellkern aufgrund der Membranverdichtung nur noch schattenhaft sichtbar. Er war zu diesem Zeitpunkt an der Peripherie der Zellen zu finden und zeigte noch keine erkennbaren Veränderungen. Nach etwa 40 Min. wanderte bei einigen L-Zellen die zytoplasmatische Granula an die Peripherie der Zelle. Viele Zellen zeigten in dieser Phase eine Auflösung ihrer äußeren Begrenzung und lösten sich anschließend in Form feingranulierten Zytoplasmas auf, in dem der Zellkern nicht mehr zu erkennen war. Bei anderen Zellen wurde die Oberfläche aufgelockert, so daß der Zellkern wieder deutlicher in Erscheinung trat. Auch zu diesem Zeitpunkt konnten am Zellkern keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden. Nach etwa 60 Min. brach meist an einer Stelle die Zellwand auf, und der Zellinhalt ergoß sich nach außen. Bei völliger Entleerung des Zellinhaltes blieben nur noch leere Hüllen zurück. Der Zellkern selbst blieb bis kurz vor der Zellauflösung in scheinbar unverändertem Zustand (Abb. 7).

Bemerkenswert war, daß es immer einige Zellen gab, die nur sehr spät oder gar nicht ihre Zellausläufer einzogen.

Abb. 7

Einwirken der durch Gelfiltration an Sephadex - G - 100 - superfine gereinigten Protease auf L-Zellen.

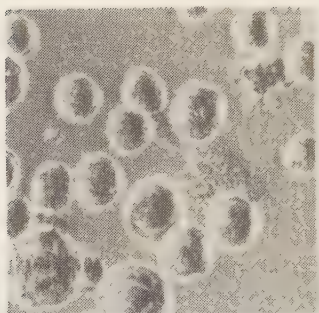
Die Fotografien sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen bei 320-facher Vergrößerung (Objektiv¹⁾: Wasserimmersionsachromat 40/ 0,75 W).



- a) nach 60 Min. bei 37°C mit HES (Kontrolle)
- b) nach 10 Min. bei 37°C mit 4 WTD_{50} der gereinigten Protease
- c) nach 20 Min. bei 37°C mit 10 WTD_{50} der gereinigten Protease
- d) nach 40 Min. bei 37°C mit 40 WTD_{50} der gereinigten Protease

1) Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

e



f

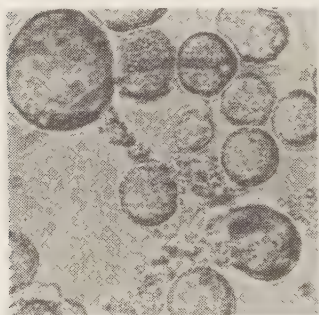


Abb. 7 (Fortsetzung)

e) nach 50 Min. bei 37°C mit 4 MTD₅₀ der gereinigten Protease

f) nach 60 Min. bei 37°C mit 4 MTD₅₀ der gereinigten Protease

In einem Kontrollversuch mit L-Zellen wurde untersucht, welchen Einfluß die Bebrütungstemperatur auf die Proteaseaktivität hatte. Ebenfalls konnte überprüft werden, ob eventuelle Reste des Zellkulturmediums und des Serumzusatzes, die durch das Waschen mit EBSS nicht entfernt werden konnten, die Proteaseaktivität in ihrer Wirkung beeinträchtigten.

Nach 1 Std. war weder bei der 4°C - noch bei der 37°C - Bebrütung eine Aktivitätsabnahme der Protease in Gegenwart der Testzellen feststellbar (Abb. 8). Bei einer Temperatur von 37°C waren alle Testzellen nach 1 Std. zerstört. Die Bebrütung bei 4°C dagegen zeigte nach 1 Std. keine im Trypanblau-Test erfaßbaren Schädigungen. Reste des Zellkulturmediums und des Serumzusatzes hatten offensichtlich keinen Einfluß auf die Proteaseaktivität.

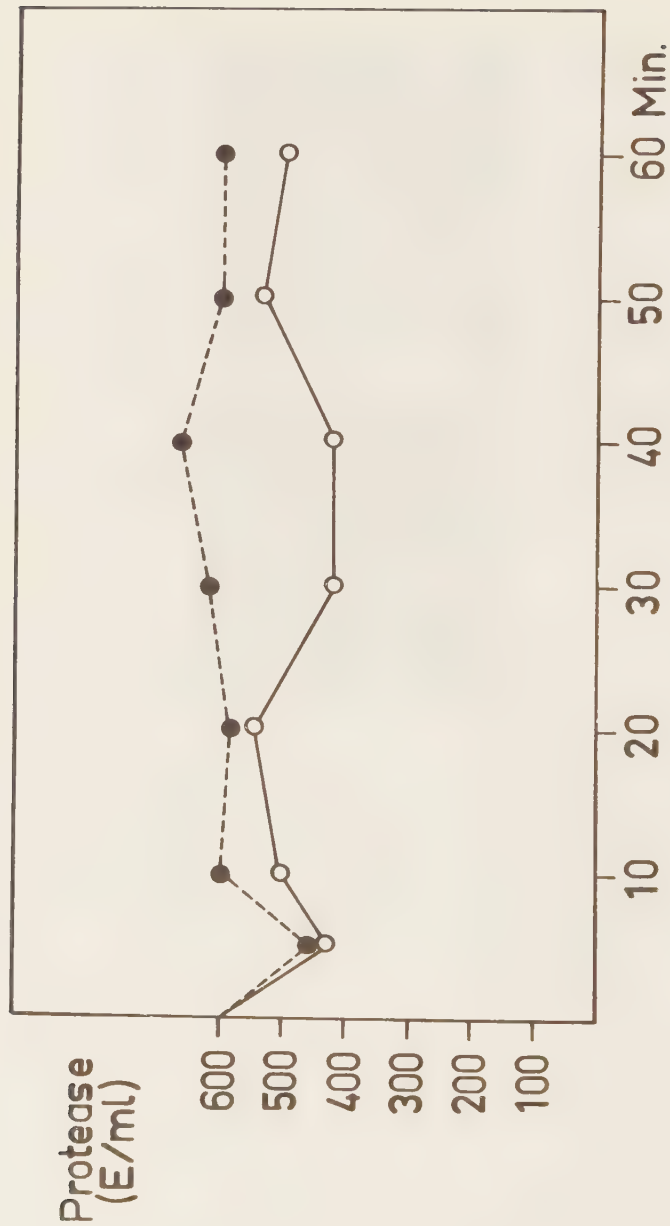


Abb.8 Proteaseaktivitäten nach Zugabe zu einer L-Zellkultur bei 4°C (○—○) und bei 37°C (●---●)

4.7 11 Freisetzung zell-oberflächen Enzyme nach Einwirkung der gereinigten Protease

Nachdem sich der Zellrasen der L-Zellkulturen geschlossen hatte, wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen zweimal mit HBSS gewaschen.

Nach Zugabe von 4 mIU_{50} konnten die ersten Aktivitäten der aus den L-Zellen ausgetretenen Zellenzyme, Lactat- bzw. Glutamatdehydrogenase, nach 10 bzw. 20 Min. nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Zellen zu einem großen Teil noch im gestreckten Zustand und ließen keine morphologischen Veränderungen erkennen. Nach 40 Min. stieg die Glutamatdehydrogenase-Aktivität nicht weiter an. Alle Zellen waren zu dieser Zeit abgerundet, zeigten aber noch keine Auflösung. Bis zu 60 Min. konnte ein leichter Anstieg der LDH-Aktivität festgestellt werden (Abb. 9).

4.7 2 Inaktivierung der Protease durch Erwärmung

Die Aufbewahrung der an Sephadex G-100 - superfine gereinigten Protease (Peak II) bei 4°C über 6 Wochen führte zu keinem Aktivitätsverlust. Dagegen war nach 10 Min. Erwärmen auf 60°C nur noch 50 % der Proteaseaktivität nachweisbar. Die Erwärmung auf 80°C führte nach 10 Min. zur völligen Inaktivierung.

Parallel zur Abnahme der Proteaseaktivität kam es zu einem Verlust der Zytotoxizität der Protease für L-Zellen (Abb. 10).

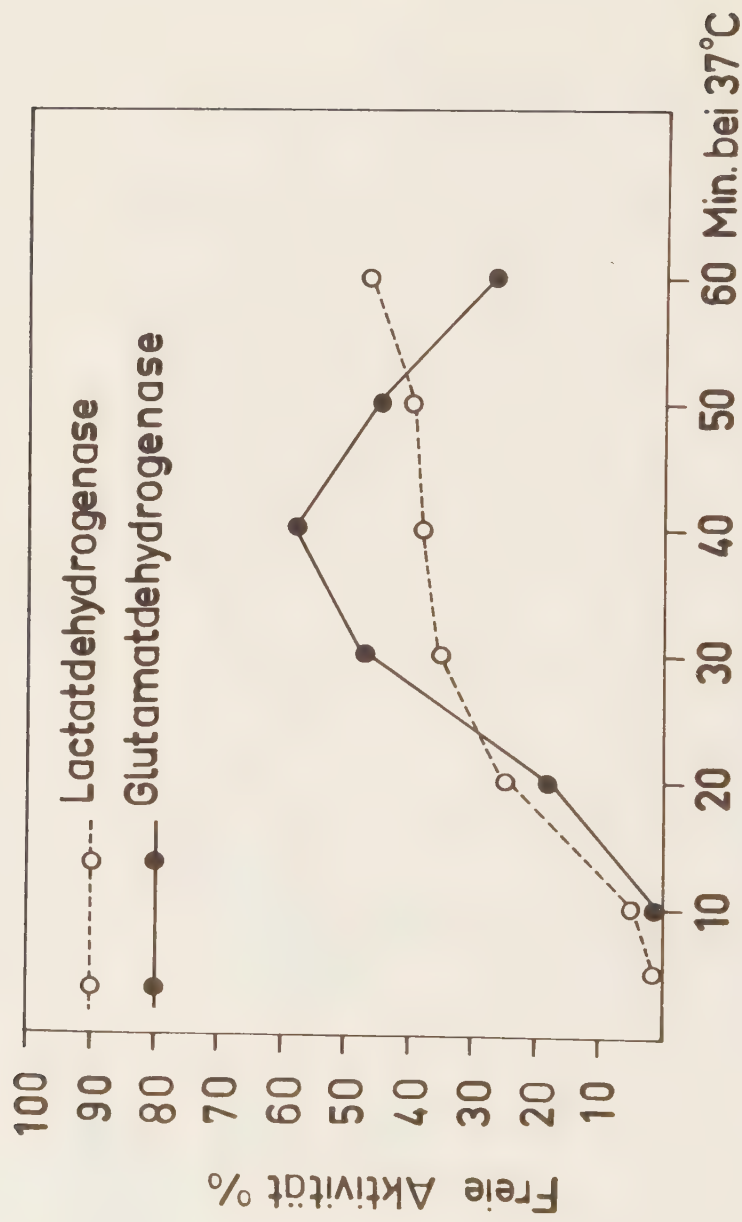


Abb.9 Austritt zellgebundener Enzyme aus L-Zellen
nach Einwirken der gereinigten Protease

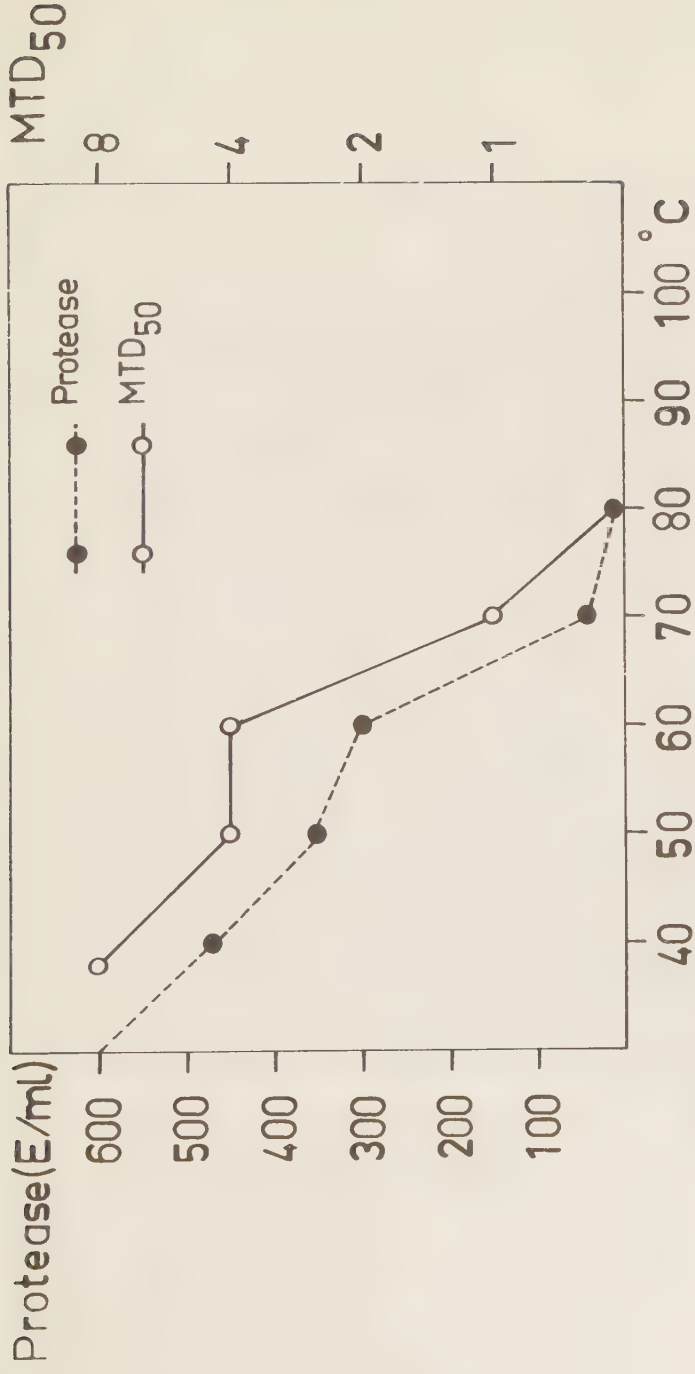


Abb.10 Inaktivierung der gereinigten Protease durch Erwärmen für jeweils 10 Min.

4.8. Immunologische Untersuchungen

4.8 1 Neutralisationstest

Das von einem Kaninchen gewonnene Antiserum gegen die an Sephadex G - 100 - superfine gereinigte Protease war noch in einer Verdünnungsstufe von 1 : 32 in der Lage, die Aktivität von 600 E Protease/ml deutlich zu hemmen. Auch im Normalserum konnte noch in einer Verdünnungsstufe von 1 : 4 eine Aktivitätsminderung festgestellt werden. Die Bebrütung in HBSS bei 37°C hatte keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms (Abb. 11).

4.8 2 Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony

Der doppelte Agargel - Diffusionstest wurde mit den durch Gelfiltration gewonnenen 4 Protein - Fraktionen (Abb. 6) der aus dem Kulturüberstand von P. aeruginosa, Stamm 75, stammenden Proteine durchgeführt. Der Diffusionstest erfolgte gegen ein Antiserum, das Antikörper gegen die durch Gelfiltration an Sephadex-G-100-superfine gereinigte Protease enthielt. Die Proteinfraktionen, die Protease enthielten (Nr. 2 und 3 in Abb. 12), bildeten ineinander übergehende Präzipitationslinien und erwiesen sich somit als immunologisch identisch. Im 1. und 4. Peak (Nr. 1 und 4 in Abb. 12) konnten keine im Diffusionstest erfaßbaren Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden.

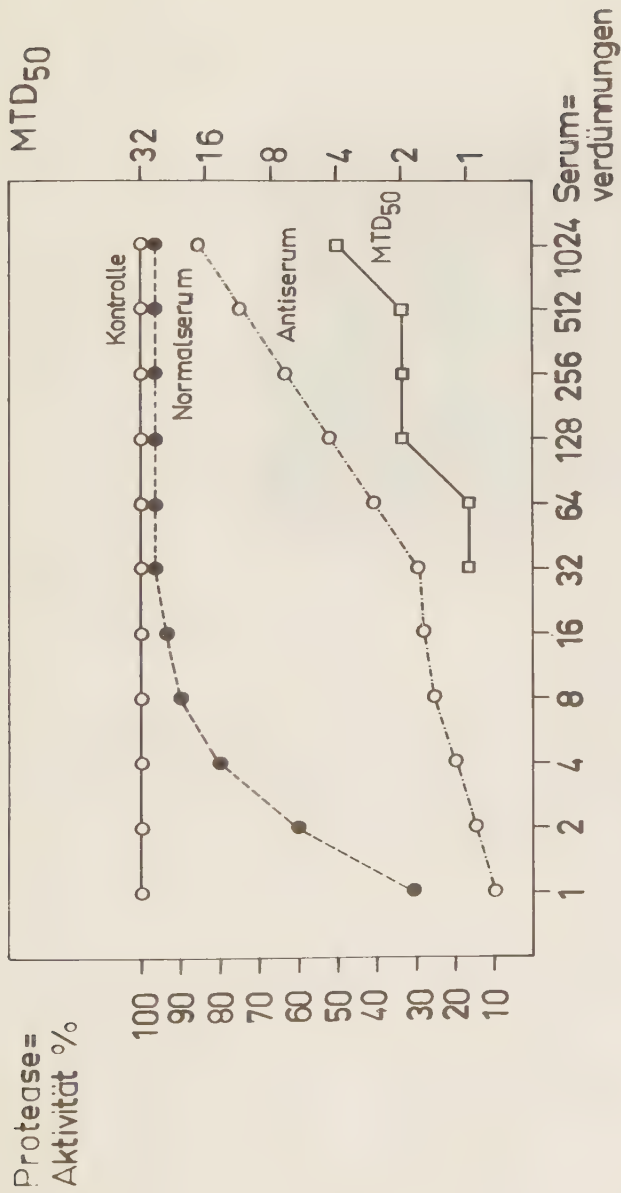


Abb.11 Aktivitätshemmung der gereinigten Protease(600E/ml) durch Antiserum und Normalserum

- Proteaseaktivität bei Bebrütung in HBSS
- " " " Normalserum
- " " " Antiserum
- MTD der gereinigten Protease in Gegenwart von Antiserum

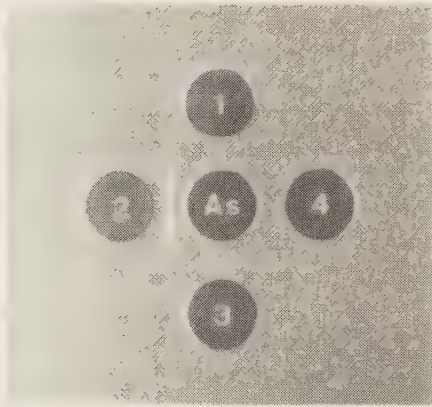


Abb. 12 Doppelte Agargel-Diffusion

As = Antiserum gegen Sephadex G - 100 - superfine gereinigte Protease.

1, 2, 3 und 4 = Protein-Fractionen der durch Gelfiltration an Sephadex - G - 100-superfine gereinigten, aus dem Kulturüberstand von Pseudomonas aeruginosa, Stamm 75 (Abb. 6), stammenden Proteine.

4.9 Chemotaktische Eigenschaften der gereinigten Protease

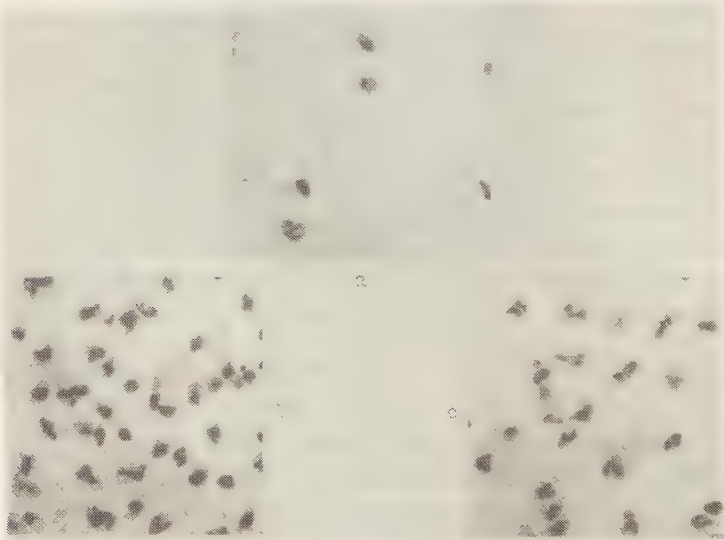
Die Untersuchung auf chemotaktische Eigenschaften der an Sephadex G - 100 - superfine gereinigten Protease (Peak II) erfolgte mittels der modifizierten BOYDEN-Hammer - Technik.

In Versuchen mit Leukozyten vom Rind zeigte sich, daß die gereinigte Protease in Gegenwart von homologem Serum chemotaktisch wirkte. Wie die Auszählung von jeweils 10 Gesichtsfeldern ergab, wanderten im Mittel 176 Leukozyten/Gesichtsfeld bei einer Endkonzentration von 12,5 µg Protein/ml (75 E) durch die Filtermembran. Bei einer Endkonzentration von 6,25 µg Protein/ml (37 E) wurden im Mittel 75 Leukozyten/Gesichtsfeld angelockt. In einem Kontrollversuch mit HBSS konnten dagegen nur 6 Leukozyten/Gesichtsfeld ausgezählt werden (Abb. 13).

**Abb. 13: Nachweis der chemotaktischen Eigenschaften
der gereinigten Protease**

Die Fotografien zeigen die in die Filtermembran der BOYDEN-Kammer eingewanderten Leukozyten vom Rind, die durch die chemotaktische Wirkung der Protease angelockt wurden.

(Vergrößerung: 320 - fach, Objektiv¹⁾: Plan 40/0,65)



- a) gewanderte Leukozyten in Gegenwart von HBSS (Kontrolle)
- b) gewanderte Leukozyten in Gegenwart von Protease bei einer Endkonzentration von 12,5 µg Protein/ml (75 E)
- c) gewanderte Leukozyten in Gegenwart von Protease bei einer Endkonzentration von 6,25 µg Protein/ml (37 E)

1) Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

5.0 Diskussion

Die Protease (Elastase) von Pseudomonas aeruginosa hat in letzter Zeit als mutmaßlicher Pathogenitätsfaktor an Bedeutung gewonnen. MARGARETTEN et al.⁵² beobachteten bei mit P. aeruginosa - infizierten Personen eine nekrotisierende Vasculitis, die sie auf die proteolytische Aktivität der Pseudomonaden zurückführten. In zahlreichen Untersuchungen über die Pathogenität dieses Keimes wurde neben anderen Enzymen vor allem der Protease (Elastase) eine wichtige Rolle im Pathogenitätsmechanismus zugeschrieben^{8,17,30,32,44,53,59,62}.

In dieser Arbeit wurde zunächst versucht, für Mäuse und Zellkulturen toxisch wirkende P. aeruginosa - Stämme zu ermitteln, und die toxischen Substanzen aus dem Kulturüberstand zu isolieren und zu charakterisieren. In weiteren Reinigungsschritten durch Gelfiltration und isoelektrisches Fokussieren konnte die Toxinwirkung nicht von der proteolytischen Aktivität abgetrennt werden. Es erschien daher möglich, daß die Protease die Toxinwirkung verursachte. Die von mir ermittelten isoelektrischen Punkte der Protease lagen im Gegensatz zu denen von SCHARMANN und BALKE⁷⁴ und MORIHARA et al.⁵⁷ gefundenen Werten bei pH $5,6 \pm 0,2$ und pH $7,2 \pm 0,2$. LIU⁴⁵ konnte nach Bebrütung der Pseudomonaden in Kaninchenserum nur geringe Mengen Protease nachweisen, da das Enzym durch α_2 -Makroglobulin im Serum gehemmt wurde³⁰. Während die Proteasebildung im Plasma vom Menschen und Rind im Gegensatz zu TSB mit 0,5 % Glukosezusatz nur um 10 bzw. 30 % vermindert war, konnte bei Wachstum der Pseudomonaden in fötalem Kälberserum eine verstärkte Proteasebildung festgestellt werden. Im Schafplasma wurden gegenüber TSB mit 0,5 % Glukosezusatz nur 20 % der Proteaseaktivität gemessen.

Diese Befunde könnten einen unterschiedlichen Gehalt an α_2 -Makroglobulin im Plasma bzw. Serum beim Menschen und bei den verschiedenen Tierarten andeuten. MÜLLER⁵⁹ vermutete bei seinen Arbeiten über Pseudomonas aeruginosa - Proteasen, daß Zellproteine ähnlich wie Plasmaproteine vom Menschen angegriffen und verändert werden. Dies hätte seiner Meinung nach große Bedeutung für die Pathogenität der Pseudomonaden. Diese Vermutung konnte durch Versuche mit der Protease an Zellkulturen nur zum Teil bestätigt werden. Während 12,5 µg Protein/ml (75 E) bzw. 6,25 µg Protein/ml (37 E) ausreichten, um 50 % der L-Zellen bzw. Kälberhodenzellen zu schädigen, konnten selbst mit 1000 µg Protein/ml (6000 E) keine Schädigungen der Nierenzellen von Kaninchen und Schwein erreicht werden. Diese unterschiedlichen Reaktionen der Zellarten auf die Einwirkung der Protease lassen einen unterschiedlichen Aufbau der Zellmembranen und damit differierende Empfindlichkeiten vermuten. Schädigungen der Zelle, speziell ihrer zytoplasmatischen Membran, führen oft zum Austritt zellgebundener Enzyme ins Kulturmedium⁷⁷, wo sie vorübergehend weiterwirken können¹⁰. Bereits nach 10- bzw. 20-minütigem Einwirken der Protease konnten die ersten Aktivitäten der Lactat- bzw. Glutamatdehydrogenase im Kulturüberstand von L-Zellen nachgewiesen werden. Der Austritt dieser Leitenzyme⁸⁶ für das lösliche Zytoplasma und Mitochondrien ohne erkennbare morphologische Veränderungen der Testzellen, ließen einen membranspezifischen Effekt der Protease vermuten. Aus den Versuchen könnte abschließend gefolgert werden, daß die Protease bei den untersuchten Pseudomonaden mit der Toxinwirkung identisch war.

6.0 Zusammenfassung

Von den Kulturüberständen von 20 Pseudomonas aeruginosa - Stämmen erwiesen sich 2 als sehr stark toxisch, 4 als stark und 14 als nicht oder nur geringgradig toxisch für Mäuse. Die optimalen Bedingungen für die Bildung der toxischen Substanzen bei den P. aeruginosa - Stämmen 47 und 75 waren eine 24-stündige Bebrütung bei 32°C in Trypticase - Soy - Broth mit Zusatz von 0,5 % Glukose. Die toxisch wirkenden Substanzen wurden bei den Stämmen 47 und 75 schon während der logarithmischen Wachstumsphase gebildet. Zu dieser Zeit konnten auch proteolytische Aktivitäten im Kulturüberstand beider Stämme nachgewiesen werden.

Die Kulturüberstände von 10 P. aeruginosa - Stämmen wurden nach Einengung durch Dialyse gegen Polyäthylenglykol an Sephadex - G - 100 - superfine filtriert. Dabei kam es zur Bildung von 4 Protein - Fraktionen, in denen lipolytische, hämolytische und proteolytische Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. Die Protein-Fraktion mit der höchsten Proteasekonzentration enthielt zugleich auch die toxische Wirkung für Mäuse und Zellkulturen. Nach einer weiteren Analyse mittels isoelektrischen Fokussierens kam es zu einer Aufspaltung der Protease in 2 Komponenten. Die isoelektrischen Punkte lagen bei pH 5,6 $\pm$ 0,2 und pH 7,2 $\pm$ 0,2. Die Hauptkomponente, die die höhere Proteasekonzentration enthielt, zeigte toxische Wirkung auf Mäuse und Zellkulturen. Somit gelang es nicht, die Protease von der Toxinwirkung abzutrennen.

Protease von P. aeruginosa, Stamm 75, konnte durch

Ammoniumsulfat - und Acetonfällung unter Eliminierung des Hämolysins gewonnen werden. Durch anschließendes Filtrieren an Sephadex - G - 100 - superfine war die in der Präparation noch vorhandene Lipase von der Protease abgetrennt worden.

Die Protease teilte sich dabei in 2 Peaks auf, die beide Casein und Elastin spalteten.

Bei Einwirkung der gereinigten Protease auf Zellkulturen konnten die gleichen morphologischen Veränderungen festgestellt werden wie bei dem unbehandelten Kulturüberstand. Während 75 E Protease in 12,5 µg Protein/ml bzw. 37 E Protease in 6,25 µg Protein/ml ausreichten, um 50 % der L-Zellen bzw. Kälberhodenzellen zu schädigen, konnten selbst mit 6000 E Protease in 1000 µg Protein/ml keine im Trypanblau-Test erfassbaren Schädigungen bei Nierenzellen von Kaninchen und Schwein beobachtet werden. Nach 10- bzw. 20-minütigem Einwirken der gereinigten Protease (Elastase) waren die aus L-Zellen ausgetretenen Zellenzyme, Lactatdehydrogenase bzw. Glutamathydrogenase, im Kulturüberstand nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt ließen die Zellen noch keine morphologischen Veränderungen erkennen. Die Bebrütung von L-Zellen mit der gereinigten Protease bei 4°C führte zu keinem zytotoxischen Effekt.

Im Plasma vom Menschen, Rind und Schaf war die Proteasebildung von P. aeruginosa, Stamm 75, im Gegensatz zu Tryptic - Soy - Broth mit einem 0,5 %igen Glukosezusatz vermindert. In fötalem Kälberserum konnte hingegen eine vermehrte Proteasebildung nachgewiesen werden.

Die gereinigte Protease (Elastase) wurde durch Erwärmen auf 80°C nach 10 Min. inaktiviert. Gleichzeitig kam es auch zu einem Verlust der Zytotoxizität.

Im doppelten Immundiffusionstest erwiesen sich beide, aus dem Kulturüberstand stammenden, durch Gelfiltration erhaltenen Protease - Peaks (I und II) als immunologisch identisch. Die an Sephadex G - 100 - superfine gereinigte Protease stimulierte die Bildung von Antikörpern, die ihre enzymatische Aktivität weitgehend neutralisierten. Auch im Normalserum konnte eine Aktivitätshemmung der Protease in den beiden ersten Verdünnungsstufen beobachtet werden.

In Gegenwart von homologem Serum erwies sich die gereinigte Protease (Elastase) deutlich chemotaktisch für Leukozyten vom Rind.

7.0 Literaturverzeichnis

1. ABDOU, M.A.-F.: In Pharmazeutika unerwünschte Mikroorganismen. I. Pseudomonas aeruginosa: Bedeutung, Vorkommen, Nachweis und Bekämpfung.
Pharm. Ind. 35, 857 - 867 (1973)
2. ALEXANDER, J.W.: Proceeding of the international conference on nosocomical infections.
Center for Disease Control, Atlanta (1970)
3. ARRIDSON, S., WADSTRÖM, T.: Detection of proteolytic activity after isoelectric focussing in polyacrylamide gel. Biochim. Biophys. Acta, 310, 418 - 420 (1973)
4. BALKE, .E., SCHARMANN, W.: Untersuchungen an einer Protease (Elastase) von Pseudomonas aeruginosa.
II. Charakterisierung des Enzyms
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355,
958 - 968 (1974)
5. BERK, R.S.: Partial purification of the extracellular hemolysin of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bact. 88, 559 - 565 (1964)
6. BOEHRINGER GMBH: Biochemica Information, Mannheim,
121 - 122 (1973)
7. BOOTH, E.V.: Methods for studying the epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in the hospital environment. Can. J. Med. Technol. 214 - 223 (1969)
(Nachdruck)

- C. BOTZENHART, K., EBEL, E.A.: Zytotoxische Aktivität von Pseudomonas aeruginosa in Beziehung zu Lecithinase, Lipase, Proteinase, Hämolysin und Oberflächenaktivität.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225, 387 - 397 (1973)
9. BOYDEN, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on PMN-Leucocytes.
J. Exptl. Med. 115, 453 (1962)
10. BUCHER, O.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
Med. Verlag Hans Huber, Bern (1970)
11. BURCK, H.C.: Histologische Technik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973)
12. BURNS, R.P.: Pseudomonas eye infection as a cause of death in premature infants.
Arch. Ophthalmol. 65, 517 - 525 (1961)
13. CALLAHAN, L.T.: Purification and characterization of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin.
Inf. Immun. 9, 113 - 118 (1974)
14. CALLAHAN, W.S., BEYERLEIN, B., NULL, J.D.: Toxicity of Pseudomonas aeruginosa slime.
J. Bact. 88, 805 - 806 (1964)
15. CASELITZ, F.H.: Pseudomonas-Aeromonas und ihre humanmedizinische Bedeutung.
Gustav Fischer Verlag, Jena (1966)

16. CHATURVEDI, U.C., NATHUR, A., KHAN, A.M., NIKHOTRA, R. .S.:
Cytotoxicity of filtrates of hemolytic
Escherichia coli.
J. Med. Microbiol. 2, 211 - 218 (1959)
17. CURTIN, J.A., PETERSDORF, R.G., BENETT, J.L. Jr.:
Pseudomonas bacteremia. Review of ninety-
one cases.
Ann. Intern. Med. 54, 1077 - 1107 (1961)
18. DIENER, B., CARRICK, L. Jr., BERK, R.S.: In vivo
studies with collagenase from Pseudomonas
aeruginosa.
Inf. Immun. 7, 212 - 217 (1973)
19. DIMITRACOPOULOS, G., SENASKOVIC, J.W. BARTELL, P.F.:
Slime of Pseudomonas aeruginosa: In vivo
production.
Inf. Immun. 10, 152 - 156 (1974)
20. FIERER, J., TAGLOR, P.M., GEZON, H.M.: Pseudomonas
aeruginosa epidemic traced to delivery-room
resuscitators.
New Eng. J. Med. 275, 991 - 996 (1967)
21. FINLAND, M., JONES, W.F., BARNES, H.W.: Occurrence
of serious bacterial infections since intro-
duction of antibacterial agents.
J.A.M.A. 170, 2188 - 2197 (1959)
22. FISHER, E. Jr. ALLEN, J.H.: Corneal ulcers produced by
cell-free extracts of Pseudomonas aeruginosa.
Am. J. Ophthalmol. 46, 21 - 27 (1958)

23. FORKNER, C.F., FREI, E., EDGEOMB, J.M., UTZ, J.P.:
Pseudomonas septicemia.
Observation on twenty-three cases.
Am. J. Med. 25, 877 (1958)
24. GABLIKS, J. SOLOTOROVSKY, M.: Cell culture reactivity
to Diphtheria, Staphylococcus, Tetanus and
Escherichia coli toxins.
J. Immunol. 88, 505 - 512 (1962)
25. GOERTLER, V.: Die Bedeutung der Feststellung von
Bacterium pyocyaneum im Präputium und im
Sperma von Besamungsbullen.
Mh. Vet. Med. 9, 9 - 12 (1954)
26. GÖTZE, R.: Paarungs- und Besamungsinfektionen beim Rind.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 57, 377 - 382 (1950)
27. HABS, H.: Pseudomonas aeruginosa - Infektionen.
In: Grumbach, A., W. Kikuth, O. Bonin:
Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre
Erreger. Bd. I. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
(1969)
28. HECKLY, R.J.: Toxins of Pseudomonas. In: Microbial
Toxins, Vol. III: Bacterial Protein Toxins
ed. by T.C. Montie, S. Kadis, S.J. Ajl.
Academic Press (1970)
29. HEDBERG, M., MILLER, J.K. TOMPKINS, V.N.: Elastase
activity of Pseudomonas aeruginosa isolates
from hospital patients.
Am. J. clin. Path. 39, 631 - 633 (1969)

30. HOCHSTRASSER, K., THEOPOLD, H.M., BRANDT, O.:
Zur Hemmbarkeit der Proteinasen aus Pseudomonas aeruginosa durch α_2 -Makroglobulin
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 354,
1013 - 1016 (1973)
31. HUGH, R., LEIFSON, E.: The taxonomic significance of
fermentativ versus oxidative metabolism of
carbohydrates by various gramnegative bacteria.
J. Bact. 66, 24 - 26 (1953)
32. JOHNSON, G.G., MORRIS, J.M., BERK, R.S.: The extracellular
protease from Pseudomonas aeruginosa
exhibiting elastase activity.
Can. J. Microbiol. 13, 711 - 719 (1967)
33. KIELWEIN, G.: Die Isolierung und Differenzierung von
Pseudomonaden aus Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 2, 29 - 37 (1971)
34. KING, J.: Glutamat-Dehydrogenase: Farb-Test.
In: H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Band I.
Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. (1970)
35. KING, E.O., WARD, M.K., RANEY, D.E.: Two simple media
for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.
J. Lab. Clin. Med. 44, 301 - 307 (1954)
36. KIRCHNER, P.: Die Typisierung von Pseudomonas aeruginosa
mit Pyocinen.
Vet. med. Diss., Gießen (1971)

37. KLEICKMANN, A.: Chemotaktische Aktivitäten einiger mutmaßlicher Pathogenitätsfaktoren von Staphylococcus aureus.
Vet. med. Diss., Gießen (1974)
38. KÜSTER, K.: Leukozyde Substanzen von Pseudomonas aeruginosa.
Vet. med. Diss., Gießen (1972)
39. KOVACS, N.: Identification of Pseudomonas aeruginosa by the oxidase reaction.
Nature 178, 703 (1956)
40. KREGER, A.S., GRIFFIN, O.K.: Physiochemical fractionation of extracellular cornea - damaging proteases of Pseudomonas aeruginosa.
Inf. Immun. 9, 828 - 834 (1974)
41. KUCERA, M., LYSENKO, O.: The mechanism of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa: V. Isolation and properties of the proteinases toxic for larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* L..
Folia Microbiol. 13, 288 - 294 (1968)
42. KUNITZ, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor.
II. General properties.
J. Gen. Physiol. 30, 291 - 310 (1947)
43. LIU, P.V.: Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*.
J. Bact. 74, 718 (1957)

44. LIU, P.V.: The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis.
II.: Effects of lecithinase and protease.
J. Inf. Dis. 116, 112 - 116 (1966)
45. LIU, P.V.: The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis. III. :
Identity of the lethal toxin produced in vitro
and in vivo.
J. Inf. Dis. 116, 481 - 489 (1966)
46. LIU, P.V., MERCER, C.B.: Growth, toxigenicity and
virulence of Pseudomonas aeruginosa.
J. Hyg. Camb. 61, 485 - 491 (1963)
47. LIU, P.V., ABE, Y., BATES, J.L.: The roles of various
fractions of Pseudomonas aeruginosa in its
pathogenesis.
J. Inf. Dis. 108, 218 - 228 (1961)
48. LIU, P.V., HSIEH, H.-C.: Inhibition of protease pro-
duction of various bacteria by ammonium salts:
Its effect on toxin production and virulence.
J. Bact. 99, 406 - 413 (1969)
49. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.T., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the Folin - Phenol -
Reagent.
J. Biol. Chem. 123, 265 - 275 (1951)
50. LÜCKE, A.: Die sogenannte blaue Eiterung und ihre
Ursachen.
Arch. Klin. Chir. 3, 135 - 157 (1862)

51. LYSENKO, O.: The mechanism of pathogenicity of Pseudomonas aeruginosa. II^A toxic substance produced in filtrates of cultures.
J. Insect. Path. 5, 83 (1963)
52. MARGARETTEN, W., HISAYO, N. LANDING, B.H.: Significance of selective vasculitis and bone - marrow - syndrome in Pseudomonas septicemia.
New Engl. J. Med. 265, 773 - 776 (1961)
53. MEINKE, G., BARUM, J., ROSENBERG, B., BERK, R.S.:
In vivo studies with the partially purified protease (elastase) from Pseudomonas aeruginosa.
Inf. Immun. 2, 583 - 589 (1970)
54. MEINKE, G., BERK, R.S.: In vivo studies with a toxic fraction of Pseudomonas aeruginosa.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 360 - 363 (1970)
55. MEITERT, E., MEITERT, T.: Pseudomonas aeruginosa
In: Infektionskrankheiten und ihre Erreger, Bd. 14:
Lysotomie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1973)
56. MORIHARA, K.: Production of elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa.
J. Bact. 88, 745 - 757 (1964)
57. MORIHARA, K., TSUZUKI, H., OKA, T., INOUE, H., EBATA, I.:
Pseudomonas aeruginosa elastase.
Isolation, crystallization, and preliminary characterization.
J. Biol. Chem. 240, 3295 - 3304 (1965)

58. MULL, J.D., CALLAHAN, W.S.: The role of the elastase of Pseudomonas aeruginosa in experimental infection.
J. Exp. Mol. Pathol. 4, 567 - 575 (1955)
59. MÜLLER, H.E.: Über die in-vivo-Wirkungen von Pseudomonas aeruginosa - Proteinasen auf menschliche Plasmaproteine.
Dtsch. med. Wschr. 31, 1278 - 1282 (1971)
60. MÜLLER, H.E.: Über die Einwirkung bakterieller Enzyme auf menschliche Plasmaproteine, insbesondere über die Neuraminidase bei Pasteurella multocida
Habilitationsschrift, Bonn (1970)
61. MÜLLER, H.E.: Methodische Untersuchungen in vitro zur Einwirkung bakterieller Proteasen auf menschliche Plasmaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 216, 79 - 87 (1971)
62. MUSZYNSKI, Z.: Enzymatic and toxinogenic activity of culture filtrates of high and low virulent strains of Pseudomonas aeruginosa on mice.
Path. Microbiol. 39, 135 - 147 (1973)
63. NEUMANN, H.J., SEELING, G.: Bacterium pyocyaneum (Pseudomonas aeruginosa) als Mastitiserreger.
Praktischer Tierarzt 9, 245 - 254 (1956)
64. NOBLE, W.C. WHITE, P.M.: Pseudomonas and man Trans-
actions St. John's Hospital
Dermatol. Soc. 55, 202 - 208 (1969)

65. OAKLEY, C.L., BANERJEE, N.G.: Bacterial elastases.
J. Path. Bact. 85, 489 - 506 (1963)
66. PARKER, R.C.: Methods of tissue culture.
Hoeber Medical Division, Harper & Row,
New York 1964
67. PAUL, J.: Cell and tissue culture.
E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh, 1965
68. PAVLOVSKIS, O. R.: Pseudomonas aeruginosa exotoxin:
effect on cellular and mitochondrial respiration.
J. Inf. Dis. 126, 48 - 53 (1972)
69. PAVLOVSKIS, O.R., GORDON, F.B.: Pseudomonas aeruginosa
exotoxin: effect on cell cultures.
J. Inf. Dis. 125, 631 - 636 (1972)
70. PULVERER, G., KORTH, H.: Zur Biochemie und Ferment-
struktur von Pseudomonas aeruginosa.
Zbl. Bakt. I. Abt. 186, 36 - 54 (1962)
71. SACHAR, L.A., WINTER, K.K. SICHER, N., FRANKEL, S.:
Photometric method for estimation of elastase
activity.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 90, 323 - 326 (1955)
72. SCHAEGL, W., BINGÖL, R., BLOBEL, H.: Purification of
penicillinase (β -Lactamase) and acid phosphatase
from Staphylococcus aureus in one procedur.
Biochim. Biophys. Acta. 268, 542 - 549 (1972)

73. SCHARMANN, W.: Vorkommen von Elastase bei *Pseudomonas* und *Aeromonas*.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 220, 435 - 442
(1972)
74. SCHARMANN, W., BALKE, E.: Untersuchung über eine Protease (Elastase) von *Pseudomonas aeruginosa*.
I. Bildung und Reinigung der Protease.
Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 355,
443 - 450 (1974)
75. SCHARMANN, W., KRAFT, W.: Hemmung der Blutgerinnung in vitro durch Protease von *Pseudomonas aeruginosa*.
Blut, 28, 90 - 99 (1974)
76. SCHOLZ, D.: Leukozide Substanzen von *Aeromonas hydrophila*. Vet. med. Diss. Gießen (1973)
77. SCHMIDT, E., SCHMIDT, F.W.: Enzymfibel, praktische Enzymdiagnostik. Boehringer, Mannheim GMBH
(1969)
78. SCHRÖTER, J.: Cohn, F.: Beiträge zur Biologie der Pflanzen.
I. Bd. Breslau, Kern (1872)
79. SENSÁKOVIC, J.W., BARTELL, P.F.: The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: biological characterization and possible role in experimental infection.
J. Inf. Dis. 129, 101 - 109 (1974)
80. SIEBERT, G.: Biochemie der Zellstrukturen. In:
Handb. allg. Pathol. Bd. 2, Springer - Verlag,
Berlin (1968)

81. STONE, H.H.: Control of infections in major burns:
With special emphasis on *Pseudomonas* infections.
J. Ped. Surg. 3, 3 - 11 (1958)
82. TEPLITZ, C.: Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*
vasculitis and cystic lesions.
Arch. Pathol. 80, 297 - 307 (1965)
83. TILL, J.: Untersuchung zum Vorkommen und zur Charakterisierung milchhygienisch bedeutungsvoller *Pseudomonaden*.
Vet. med. Diss. Gießen (1959)
84. TINNE, J.E., GORDON, A.H., BAIN, W.H., MACKEY, W.A.:
Cross-infektion by *Pseudomonas aeruginosa* as a hazard of intensive surgery.
Brit. med. J. 4, 313 - 315 (1967)
85. WALDVOGEL, F.A., SWARTZ, M. N.: Collagenolytic activity of Bacteria.
J. Bact. 98, 662 - 667 (1969)
86. WIELAND, T., PLEIDERER, G.: Molekularbiologie:
Bausteine des Lebendigen
Umschau - Verlag, Ffm. (1969)
87. WILKINSON, P.C.: Characterization of the chemotactic activity of casein for neutrophil leucocytes and macrophages.
Experientia 28, 1051 (1972)

88. WILLIAMS, R., WILLIAMS, E.D., HYAMS, D.E.: Cross -
infection with Pseudomonas aeruginosa.
Lancet 1, 376 - 379 (1960)
89. WILSON, G.S., MILES, A.A.: Topley and Wilson's prin-
ciples of bacteriology and immunity.
London (1957)
90. WISSLER, J.H., STECHER, V., SORKIN, E.: Chemistry
and biology of the anaphylatoxin related serum
peptide system. III. Evaluation of leucotactic
activity as a property of a new peptide system
with classical anaphylatoxin and cytotoxin as
components.
Eur. J. Immunol. 2, 90 - 96 (1972)

Lebenslauf

- 1946 23. Dezember geboren in Homberg/Efze
- 1953 - 1957 Volksschule Fritzlar
- 1957 - 1966 Besuch der König - Heinrich - Schule,
Gymnasium, in Fritzlar
- 1966 17. Februar Reifeprüfung
- 1966 - 1969 Wehrdienst im 62. Panzergrenadierbataillon
Neustadt/ Krs. Warburg
- 1969 - 1973 Studium der Veterinärmedizin an der
Justus Liebig - Universität in Gießen
- 1973 16. Juli Approbation
- 1973 - 1974 Anfertigung dieser Dissertation als
Doktorand am Institut für Bakteriologie
und Immunologie der Veterinärmedizinischen
Fakultät in Gießen
- seit 1974 Als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut
für Bakteriologie und Immunologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen
angestellt.

Herrn Professor Dr. H. Blobel danke ich für die Themastellung und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Scharmann für seine stets hilfsbereite Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. J. Paulsen, Herrn Dr. P. Zerche und Herrn Dr. R. Gössler, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere in Gießen, für die Überlassung von Zellkulturen und für die fachliche Beratung bei der Durchführung der Zellkulturzüchtung.

